

**Untersuchungen zur Interaktion der Phosphoinositid-
3-Kinase γ mit Lipidmembranen**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Cornelia Kirsch
geboren am 25. April 1960 in Jena**

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Zelluläre Kommunikation	1
1.1.1.	Allgemeine Prinzipien der interzellulären Kommunikation	1
1.1.2.	Signalübertragung durch Membranrezeptoren	2
1.1.2.1.	Enzym-gekoppelte Rezeptoren	2
1.1.2.2.	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	4
1.2.	Mechanismen der Membranassoziation für Effektorproteine	6
1.3.	Zelluläre Funktion der Phosphoinositide	9
1.4.	PI-3-Kinasen	12
1.4.1.	Klassifizierung der PI-3-Kinasen	12
1.4.2.	Struktur der Klasse I PI-3-Kinasen	14
1.4.3.	Funktion der Klasse I PI-3-Kinasen	18
1.4.4.	Membranassoziationsmöglichkeiten der Klasse I PI-3-Kinasen	21
2.	Zielstellung der Arbeit	23
3.	Materialien und Methoden	24
3.1.	Materialien	24
3.1.1.	Phospholipide	24
3.1.2.	Zelllinien und Medien	24
3.1.3.	Antikörper	25
3.1.4.	Rekombinante Baculoviren	25
3.1.5.	Radioaktiv markierte Substanzen	25
3.1.6.	Chemikalien	25
3.1.7.	Puffer	27
3.1.8.	Sonstiges	29
3.2.	Methoden	29
3.2.1.	Zellkulturen	29
3.2.2.	Expression rekombinanter GST-Fusionsproteine in Sf 9-Zellen	30
3.2.3.	Zellaufschlüsse und Fraktionierung	31
3.2.4.	Reinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine	32
3.2.5.	Immunopräzipitation	32
3.2.6.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33

3.2.7.	Protein-Färbungen von SDS-Polyacrylamidgelen	34
3.2.8.	Immunoblotting	35
3.2.9.	Lipidbindungstest	35
3.2.10.	Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität	36
3.2.11.	Bestimmung der Proteinkinase-Aktivität	38
4.	Ergebnisse	39
4.1.	In vitro-Untersuchungen	39
4.1.1.	Bindung der PI-3-Kinase γ an die Substrat-Phospholipide	39
4.1.2.	Bindung der PI-3-Kinase γ an Nicht-Substrat-Phospholipide	40
4.1.3.	Untersuchungen zur Charakterisierung der PI-3-Kinase γ - Phospholipidbindung	41
4.1.3.1.	Bedeutung ionischer Wechselwirkungen	41
4.1.3.2.	Testung potentiell kompetitiver Bindungspartner	42
4.1.3.3.	Untersuchungen zur Stabilität des PI-3-Kinase γ -Phospholipid- Komplexes	44
4.1.3.4.	Einfluß der Fettsäureketten der Phospholipide auf die PI-3-Kinase γ - Bindung	45
4.1.4.	Beziehung zwischen Phospholipid-Bindung und Enzym-Aktivitäten	46
4.1.4.1.	Lipid-und Proteinkinase-Aktivität in Anwesenheit von Phospho- Lipiden	46
4.1.4.2.	PI- 3-Kinase γ -Aktivitäten nach Vorinkubation mit Phospholipiden	48
4.1.4.3.	Zusammenhang zwischen Enzym-Aktivitäten und PI-4,5-P ₂ -Bindung bei PI- 3-Kinase γ (Wildtyp) und Mutanten	51
4.1.5.	Phospholipid-Bindung an Fragmente der PI-3-Kinase γ	53
4.2.	Untersuchungen zur zellulären Lokalisation der PI-3-Kinase γ	54
4.2.1.	Verteilung der GST-Fusionsproteine der PI-3-Kinase γ in Sf 9-Zellen	54
4.2.1.1.	Protein- und Aktivitätsverteilung der GST-PI-3-Kinase γ	55
4.2.1.2.	Zelluläre Verteilung der PI-3-Kinase γ -Mutanten	56
4.2.2.	Lokalisation der nativen überexprimierten PI-3-Kinase γ in 293-Zellen	57
4.2.3.	Zelluläre Verteilung der konstitutiven PI-3-Kinase γ in U937-Zellen	58
4.2.3.1.	Translokation der PI-3-Kinase γ in Abhängigkeit von der Anwesenheit von FKS	58
4.2.3.2.	Lokalisation der PI-3-Kinase γ nach Wortmanninbehandlung der Zellen	59

4.2.3.3.	Verteilung der Retinsäure-induzierten PI-3-Kinase γ	61
4.2.3.4.	PI-3-Kinase γ -Lokalisation nach Einbau von Phospholipiden in die Zellmembran	63
5.	Diskussion	68
5.1.	Funktion und Lokalisation der PI-3-Kinase γ	68
5.2.	In vitro-Untersuchungen zur Phospholipid-Bindung der PI-3-Kinase γ	69
5.3.	Zelluläre Lokalisation der PI-3-Kinase γ	77
6.	Zusammenfassung	82
7.	Literaturverzeichnis	84

Anlagen

Publikationsverzeichnis

Lebenslauf

Selbstständigkeitserklärung

Danksagung

Abkürzungen, Begriffe

%(v/v)	Volumenprozent
293-Zellen	Humane embryonale Nieren-Zelllinie
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AU	Arbitrary Units
BSA	Rinderserumalbumin
C1-Domäne	Protein kinase C conserved region 1 domain
C2-Domäne	Protein kinase C conserved region 2 domain
cAMP	Cyclisches Adenosin-3':5'-monophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosin-3':5'-monophosphat
cGMP-PDE	cGMP-spaltende Phosphodiesterase
Ci	Curie
cPLA ₂	Cytosolische Phospholipase A ₂
cpm	counts per minute
CSF	Colony stimulating growth factor
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EEA1	Early endosome antigen 1
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycol-bis(b-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FGF	Fibroblast growth factor
g	Erdlbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guanine-nucleotide exchange factor
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
M	mol pro Liter
ME	β-Mercaptoethanol
p101	nicht-katalytische Untereinheit der Klasse I _B PI-3-Kinase γ

p110	katalytische Untereinheit der Klasse I PI-3-Kinasen
p85	nicht-katalytische Untereinheit der Klasse I _A PI-3- Kinasen α , β und δ
PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Lösung
PC	Phosphatidylcholin
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platelet derived growth factor
PDK1	Phosphoinositide dependent kinase 1
PE	Phosphatidylethanolamin
PFK2	Phospho-Frukto-Kinase 2
PH-Domäne	Pleckstrin- Homologie- Domäne
PI	Phosphatidylinositol
PI-3,4,5-P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PI-3,4-P ₂	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PI-3,5-P ₂	Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat
PI-3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PI-3-P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PI-4,5-P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PI-4-P	Phosphatidylinositol-4-phosphat
PI-5-P	Phosphatidylinositol-5-phosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB(Akt)	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PS	Phosphatidylserin
PTP	Phosphotyrosinphosphatase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rho	Ras-homologes kleines G-Protein
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf 9-Zellen	Ovarial-Zelllinie des Insekts <i>Spodoptera frugiperda</i>
SH ₂ -Domäne	Src- Homologie-2 Domäne
SH ₃ -Domäne	Src- Homologie-3 Domäne
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan

Aminosäuren sind im Text im Drei-Buchstaben-Code abgekürzt; in Tabellen und Abbildung ist der Ein-Buchstaben-Code verwendet worden:

A Ala Alanin	C Cys Cystein	D Asp Asparaginsäure
E Glu Glutaminsäure	F Phe Phenylalanin	G Gly Glycin
H His Histidin	I Ile Isoleucin	K Lys Lysin
L Leu Leucin	M Met Methionin	N Asn Asparagin
P Pro Prolin	Q Gln Glutamin	R Arg Arginin
S Ser Serin	T Thr Threonin	V Val Valin
W Trp Tryptophan	Y Tyr Tyrosin	

1. Einleitung

1.1. Zelluläre Kommunikation

1.1.1. Allgemeine Prinzipien der interzellulären Kommunikation

Das optimale Funktionieren vielzelliger Organismen setzt voraus, dass Signale aus der Umwelt wahrgenommen und Informationen zwischen den Zellen ausgetauscht werden können. Die interzelluläre Kommunikation kann über chemische Botenstoffe, elektrische Vorgänge, Gap Junctions sowie durch Zell-Zell-Interaktionen über Oberflächenproteine erfolgen. Die stimulierte signalgebende Zelle erzeugt ein spezifisches Signal, welches von der Zielzelle empfangen, weitergeleitet und verarbeitet wird. Häufig dienen für den Empfang der Signalmoleküle Rezeptoren der Zielzelle, die an der Zellmembran oder im Inneren der Zelle lokalisiert sind. Welcher Rezeptor benutzt wird, ist von der Art des Signalmoleküls abhängig. Hydrophobe Moleküle (wie Schilddrüsen- und Steroidhormone) können die Zellmembran ungehindert passieren und binden an intrazelluläre Rezeptoren (Evans, 1988; Parker, 1993). Die meisten Signalmoleküle sind jedoch hydrophiler Natur, so dass die Zellmembran für sie eine unüberwindbare Barriere darstellt. Das heißt, dass viele Neurotransmitter, Cytokine und Hormone nur an Zelloberflächenrezeptoren binden können. Diese Rezeptoren sind Membranproteine und können in zwei Klassen unterteilt werden. Die erste Klasse sind die ligand-regulierten Ionenkanäle, die in der Plasmamembran, aber auch in intrazellulären Membranen vorkommen. Da die Bindung der Signalmoleküle an die Ionenkanäle unmittelbar deren Öffnungszustand beeinflusst, vermitteln diese Rezeptoren die schnellsten bekannten zellulären Antworten. Die zweite Klasse der Membranrezeptoren binden Hormone und Cytokine wie Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone und Chemokine. Man unterscheidet je nach Art der durch Ligand-Bindung ausgelösten intrazellulären Signalübertragung zwischen G-Protein- und Enzym-gekoppelten Rezeptoren, sowie Rezeptoren die nicht unmittelbar an G-Proteine oder Enzyme koppeln.

Zur letztgenannten Gruppe gehören die trimären Todesrezeptoren, welche zur Superfamilie der Tumor Necrosis Faktor-Rezeptoren (TNFR) gehören. Diese Rezeptoren können pro-apoptotische, anti-apoptotische, anti-inflammatorische oder pro-inflammatorische Signale übertragen. Im Falle von TNFR1 kann das Signal über Adapterproteine auf Caspase 8 übertragen werden (Baud und Karin, 2001).

1.1.2. Signalübertragung durch Membranrezeptoren

1.1.2.1. Enzym-gekoppelte Rezeptoren

Diese Rezeptoren übertragen das extrazelluläre Signal direkt auf intrazelluläre Effektoren (Enzyme), wobei man zwischen Rezeptoren mit intrinsischer Enzymaktivität und Rezeptoren, an deren intrazelluläre Domäne Enzyme assoziieren können, unterscheiden muß. In beiden Fällen wird durch Änderung der Enzym-Aktivität das Signal weitergeleitet. Bei diesen Enzymen handelt es sich häufig um Tyrosinkinasen, aber auch Serin/Threonin-Kinasen, Tyrosinphosphatasen sowie Guanylat-Cyclasen kommen als Effektormoleküle vor (Songyang und Cantley, 1995; ten Dijke et al., 1996; Streuli, 1996; Garbers et al., 1994).

Interferone und Interleukine können über Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen signalisieren, indem die aktivierten Tyrosinkinasen die Rezeptormoleküle, welche keine eigene Enzymaktivität besitzen, an cytoplasmatischen Tyrosinresten phosphorylieren. Diese tyrosinphosphorylierten Rezeptorbereiche dienen nun als Andockstellen für Adapter-und Signalproteine, die für die weitere intrazelluläre Signaltransduktion verantwortlich sind.

Rezeptoren mit intrinsischer Enzymaktivität sind die Guanylat-Cyclase- Rezeptoren, die Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren sowie die Tyrosinkinase-Rezeptoren. Zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren zählen der Insulin-Rezeptor, sowie viele Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie der EGF-, der PDGF-, der FGF-oder der CSF1 -Rezeptor. Insgesamt gehören mehr als 50 verschiedene Transmembranproteine zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren, welche alle eine extrazelluläre Ligandbindungsstelle, eine α -helikale Transmembrandomäne sowie eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität besitzen. Einige Liganden wie z.B. PDGF besitzen eine Dimerstruktur und können durch Bindung an den Rezeptor die Bildung aktiver Rezeptor-Dimere induzieren. Die damit verbundene Stimulation der Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivität führt zur Autophosphorylierung an meist mehreren Tyrosinresten der intrazellulären Rezeptordomäne. Durch diese Rezeptorphosphorylierung wird zum einen die Autoinhibierung der Tyrosinkinase aufgehoben, d.h. der Rezeptor kann weitere Signalproteine an Tyrosinresten phosphorylieren. Zum anderen können jetzt verschiedene Effektorproteine mit spezifischen Bindungsdomänen an die Phosphotyrosinreste des Rezeptormoleküls binden. Bei den Effektorproteinen handelt es sich entweder um Enzyme oder um Adapterproteine, deren Funktion darin besteht, über Protein-Protein-Wechselwirkungen weitere Signalproteine zur Plasmamembran und in Rezeptornähe zu bringen. Auf dieser Ebene

ist eine starke Verzweigung und Variabilität in der Signaltransduktion möglich. Welche Proteine an den Rezeptor gebunden werden, hängt von der genauen Struktur der Bindungsdomäne des Effektorproteins und der Aminosäuresequenz-Umgebung des Rezeptor-Phosphotyrosin-Restes ab. Da die Rezeptoren meist mehrere Phosphorylierungsstellen mit unterschiedlichen benachbarten Aminosäuren aufweisen, können an einen aktivierten Rezeptor viele Effektorproteine binden.

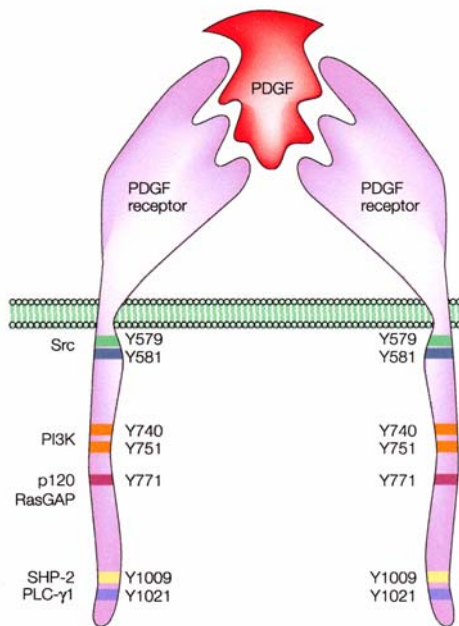


Abb. 1: Effektorproteine des PDGF-Rezeptors (nach Yaffe, 2002)

Häufig auftretende Effektorproteine von Tyrosinkinase-Rezeptoren sind:

- die Adapterproteine *Grb2*, *Shc* und *Nck*
- das GTPase-aktivierende Protein *p120-GAP*
- die Tyrosinkinase *Src*
- die Protein-Tyrosinphosphatasen *PTP1D* und *SH-PTP2*
- die Phospholipase C- γ
- die regulatorische Untereinheit p85 der PI-3-Kinasen α , β und δ

Die Rezeptor-gebundenen Effektorproteine können nun über verschiedene Mechanismen wie Tyrosinphosphorylierung (z.B. PLC γ), Konformationsänderung (z.B. PI-3-Kinase) oder Translokation (z.B. Shc-Grb2) aktiviert werden und das Signal weiterleiten.

1.1.2.2. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, auch heptahelikale- oder Serpentin-Rezeptoren genannt, bilden eine sehr große Familie von Membranrezeptoren mit über 1000 Mitgliedern (Gutkind, 1998). Eine Vielzahl extrazellulärer Signalmoleküle wie Hormone (z.B. Glucagon), Neurotransmitter (z.B. Acetylcholin), Chemokine (z.B. Interleukin 8) und lokale Mediatoren (z.B. Phosphatidsäure), aber auch sensorische Signale wie Licht, Geschmacks- und Geruchs-Signale werden durch diese Rezeptoren aufgenommen und in intrazelluläre Signale umgewandelt. Trotz dieser Vielzahl an Rezeptoren und Liganden haben alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren eine bemerkenswert ähnliche Struktur, indem sie aus einer extrazellulären N-terminalen Domäne, einer Sieben-Transmembran α -Helix-Domäne mit je drei intra-und extrazellulären Schleifen sowie einem intrazellulären C-terminalen Teil bestehen (Dohlman et al., 1991). Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besitzen keine intrinsische Enzymaktivität. Im Gegensatz zu den Enzym-gekoppelten Rezeptoren übertragen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren das extrazelluläre Signal nicht direkt auf intrazelluläre Effektoren. Stattdessen aktivieren sie ein intrazelluläres heterotrimeres Guanin-Nukleotid-bindendes Regulatorprotein (G-Protein), welches nach Aktivierung das Signal auf intrazelluläre Effektoren überträgt (Guderman et al. 1995).

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus α , β und γ -Untereinheiten. Die $G\alpha$ -Untereinheit enthält die intrinsische GTPase-Aktivität der G-Proteine und bindet GDP und GTP im Austausch, wohingegen die $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheit unter physiologischen Bedingungen assoziiert sind und als Heterodimer ($G\beta\gamma$) vorliegen. Jede dieser Untereinheiten ist Mitglied einer Genfamilie, wobei von $G\alpha$ 16, $G\beta$ 5 und $G\gamma$ 12 Proteine kloniert wurden. Die $G\alpha$ -Untereinheit wird in die vier Subfamilien $G\alpha_s$, $G\alpha_q$, $G\alpha_i$ und $G\alpha_{12/13}$ unterteilt. Im inaktiven Zustand, wenn die $G\alpha$ -Untereinheit GDP gebunden hat, sind die drei Untereinheiten als trimere Komplex ($G\alpha\beta\gamma$) assoziiert. Der aktivierte Rezeptor interagiert mit dem heterotrimeren G-Protein und fungiert als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor. Nach GTP-Bindung an die $G\alpha$ -Untereinheit dissoziiert der trimere Komplex in die $G\alpha$ -GTP-Einheit und das $G\beta\gamma$ -Heterodimer, die nun beide unabhängig voneinander separate Effektoren regulieren können (Hepler und Gilman, 1992; Clapham und Neer, 1993; Iniguez-Lluhi et al., 1993).

Die folgende Tabelle zeigt Beispiele für die G-Protein-Untereinheiten und deren Effektormodulationen (▲ Aktivierung; ▼ Inhibierung).

G-Protein-Untereinheit	Effektor
$G\alpha_s$	Adenylatcyclase ▲
$G\alpha_i$	cGMP-PDE ▲ Src-Tyrosinkinase ▲ Adenylatcyclase ▼ Öffnung von K^+ -Kanälen
$G\alpha_q$	Phospholipase $C\beta$ ▲
$G\alpha_{12/13}$	Rho-GEF ▲
$G\beta\gamma$	PI-3-Kinase γ ▲ Phospholipase $C\beta$ ▲ Phospholipase A_2 ▲ Adenylatcyclasen II und IV ▲

Tab. 1: G-Protein-Untereinheiten und ihre Effektorwirkungen (nach Pierce et al., 2002)

Als Effektoren fungieren hier vor allem Enzyme, aber auch Ionenkanäle, die als Transmembranproteine oder membranassoziierte Proteine vorliegen müssen, damit sie von den membranständigen G-Proteinen moduliert werden können. Die Aktivitätsänderung der Effektorenzyme führt häufig zur Änderung der Konzentration von niedermolekularen Botenstoffen, sogenannter „second messenger“, welche in der Plasmamembran oder im Cytosol lokalisiert sind. Die folgende Übersicht zeigt, auf welche Botenstoffe die entsprechenden Effektorenzyme Einfluss haben.

Effektorenzym	second messenger
Adenylatcyclasen ¹	cAMP ▲ ▼
cGMP-PDE	cGMP ▼
PLC β	DAG ▲ IP ₃ ▲
PI-3-Kinase γ	PI-3,4,5-P ₃ ▲

(¹ differente Regulation durch verschiedene G-Protein-Untereinheiten;
▲ Konzentrationserhöhung, ▼ Konzentrationserniedrigung)

Tab. 2: Effektorenzyme und deren Produkte (second messenger-Bildung)

Diese Botenstoffe wirken nun selber als Effektoren der Signaltransduktion, indem sie die Aktivität nachgeschalteter Proteine, häufig Proteinkinasen, regulieren und damit das Signal transferieren. Die Proteinkinasen PKA und PKC, welche durch die Botenstoffe cAMP bzw. DAG und Calciumionen reguliert werden, können ihrerseits wieder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren phosphorylieren und damit desensitivieren. Tyrosinkinaserzeptoren, wie der PDGF- und EGF-Rezeptor können auch in Antwort auf G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Agonisten phosphoryliert werden. Darüber hinaus kann die über $G\alpha_i$ stimulierte Src-Tyrosinkinase in die Signalübertragung enzymgekoppelter Rezeptoren eingreifen (Luttrell et al., 1997). Auch in die durch G-Proteine aktivierten mitogenen Signalwege sind Rezeptor- oder Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen involviert (Liebmann, 2001). Man darf also die einzelnen Rezeptor-vermittelten Signalwege nicht isoliert betrachten, sondern wir haben es hier mit einem komplexen Netzwerk der Signaltransduktion zu tun. Durch diese Vernetzung ist eine gegenseitige Regulation der Signalwege möglich, was zu abgestuften und fein regulierten Zellantworten führt. Basis für dieses multiple Netzwerk sind die vielen Möglichkeiten der Protein-Protein- sowie Protein-Lipid-Membran-Assoziationen in der Zelle.

1.2. Mechanismen der Membranassoziation für Effektorproteine

Bei der durch Membranrezeptoren vermittelten Signaltransduktion müssen cytosolische Effektorproteine zur Plasmamembran und in Rezeptornähe transloziert werden. Dazu gibt es die Möglichkeit der Protein-Protein Interaktion, wie z.B. bei Tyrosinkinaserzeptoren, oder die Bindung der Effektorproteine an Lipidmembranen. Diese Vorgänge setzen das Vorhandensein bestimmter Interaktionsdomänen innerhalb der Polypeptidkette des jeweiligen Proteins voraus.

Protein-Interaktionsdomänen ermöglichen direkte Assoziationen der Polypeptide untereinander oder mit Phospholipiden sowie kleinen Molekülen. Isolierte Interaktionsdomänen sind so in Polypeptide eingebaut, dass ihre Ligand-Bindungs-Oberflächen verfügbar sind. Sie erkennen exponierte Seiten ihrer Proteinparker, einschließlich phosphorylierter, prolinreicher oder C-terminaler Motive, oder sie binden an Kopfgruppen von Membranphospholipiden. Jede Zelle benötigt zum Funktionieren ihrer regulatorischen Systeme eine bestimmte Zahl an Interaktionsdomänen innerhalb ihrer Proteine, welche sich in verschiedenen Kombinationen vereinigen können, d.h. viele

Proteine besitzen mehrere und differente Interaktionsdomänen innerhalb ihrer Polypeptidkette.

Die wichtigsten Bindungsdomänen bei der Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelten Signaltransduktion sind die sogenannten SH2-und SH3-Domänen, die PH-Domäne sowie die PTB-Domäne, wobei nur SH2-und PTB-Domänen spezifische Bindungsdomänen für Phosphotyrosin-haltige Peptide sind. Alle Rezeptortyrosin-Kinase-bindenden Proteine besitzen mindestens eine SH2-Domäne als spezifische Rezeptorbindungsstelle. Diese ca. 100 Aminosäuren umfassende Domäne konnte in über 100 Proteinen nachgewiesen werden, wohingegen die zweite Phosphotyrosin-spezifische Bindungsdomäne, die PTB-Domäne, bisher nur in einigen Proteinen, wie dem Adaptorprotein Shc, gefunden wurde. Nicht alle PTB-Domänen binden nur Phosphotyrosin-Motive, sondern bestimmte PTB-Domänen erkennen nur oder zusätzlich nicht- phosphorylierte Peptid-Sequenzen. Die PTB-Domäne zeigt strukturelle Ähnlichkeit mit der PH-Domäne. PH-Domänen kommen in sehr vielen Proteinen, die in die intrazelluläre Signaltransduktion involviert oder Bestandteile des Cytoskeletts sind, vor. Insgesamt gibt es ca. 250 PH-Domänen im humanen Proteom. Die Funktion dieser Domäne ist bisher nur unvollständig charakterisiert. Es wird eine spezifische Verankerungsfunktion an Membranen diskutiert, da z.B. die PH-Domäne der PLC δ 1 mit hoher Spezifität an Phospholipide wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat bindet (Cohen, 1995; Pawson, 1995). Nur etwa 20 PH-Domänen erkennen spezifisch PI-3,4,5-P₃, sie enthalten ein definiertes Sequenzmotiv, welches durch ein Muster von basischen Resten in der Loop-Mitte zwischen den ersten zwei β -Strängen definiert ist. Aufgrund der Strukturähnlichkeit zur PTB-Domäne wäre aber auch eine Funktion der PH-Domäne bei Protein-Protein-Wechselwirkungen denkbar. Für die PH-Domäne der cytosolischen Tyrosinkinase Btk konnte eine Bindung an die $\beta\gamma$ -Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen und an verschiedene PKC-Isoformen gezeigt werden. Außerdem kann die PH-Domäne der Btk an die Kopfgruppen verschiedener Phosphoinositide binden. Neben der PH-Domäne gibt es noch andere Phospholipid-Bindungs-Domänen, die besonders bei der G-Proteingekoppelten Signaltransduktion von Bedeutung sind. SH3-Domänen kommen in vielen Signalproteinen der Phosphotyrosin-Signalwege vor, insgesamt gibt es ca. 330 SH3-Domänen beim Menschen. Sie binden meist an prolinreiche Sequenzen in Zielproteinen, wie z.B. die SH3-Domäne des Adapter-Proteins Grb2 an prolinreiche Motive im SOS-Protein. Funktionell können SH3-Domänen hier als Kopplungsmodule bei der Signaltransduktion angesehen werden. SH3-Domänen können aber auch eine regula-

torische Funktion, wie im Fall der SH3-Domänen von Src-Kinasen, ausüben. Durch Bindung der SH3-Domäne an externe SH3-Liganden kommt es zur Aufhebung der basalen autoinhibitorischen Interaktion dieses Enzyms. Neben den SH3-Domänen gibt es noch drei weitere Prolin-Erkennungs-Domänen (WW-, EVH1- und GYF-Domäne), die allerdings in wesentlich weniger Proteinen zu finden sind.

Bei der G-Protein- abhängigen Signaltransduktion sind vor allem die Phospholipid-Interaktions-Domänen von Bedeutung. Das Effektorenzym PI-3-Kinase γ erhöht nach Stimulation die PI-3,4,5-P₃-Konzentration in der Plasmamembran, was zur Folge hat, dass Proteine mit PI-3,4,5-P₃ spezifischer PH- oder ENTH-Domäne an die Plasmamembran binden können. Einige ENTH-Domänen sowie die FERM- und Tubby-Domäne können ebenso wie PH-Domänen PI-4,5-P₂ binden. C2-Domänen, wovon heute ca. 100 in Datenbanken zu finden sind, wurden zuerst in den konventionellen PKC's identifiziert (Xu et al., 1997). Die meisten Proteine mit C2-Domäne üben Funktionen innerhalb der Signaltransduktion aus, wie z.B. PKC, PLD, PLC, cPLA₂ und PI-3-Kinasen. C2-Domänen sah man ursprünglich als Calcium-abhängiges Phospholipid-Bindungs-Motiv an (Davletov und Suedhof, 1993), bis einige C2-Domänen in Proteinen gefunden wurden, die kein Calcium binden (Fukuda et al., 1994). Unterschiedliche C2-Domänen bevorzugen verschiedene Phospholipide, so zeigen die C2-Domänen der PKC α und PLC δ 1 Phosphatidylserin-Selektivität, wohingegen die der PLA₂ bevorzugt an Phosphatidylcholin-Membranen bindet. Als Interaktionsseite für DAG und Phorbol ester wurde zuerst die C1-Domäne in PKC's gefunden (Nishizuka, 1988). Sie kommt sowohl in den konventionellen, als auch in den neuen PKC-Isoformen als Tandem-Wiederholung (C1A und C1B) vor. C1-Domänen wurden inzwischen in anderen Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen, wie PKD, DAG-Kinase, Raf u.a. gefunden. Einige C1-Domänen binden keine Lipide, sondern sind in Protein-Protein-Interaktionen involviert (Ron und Kazanietz, 1999). Neben diesen genannten Phospholipid-Bindungs-Domänen gibt es noch zwei PI-3-P-bindende Domänen, die FYVE- und die PX-Domäne. Beide Domänen sind in Signaltransduktions-Mechanismen involviert (Overduin et al., 2001).

Außer den aufgeführten Interaktionsdomänen existieren auch noch spezifische Bindungsdomänen für phosphoserinhaltige Peptide. Kürzlich wurden die phosphorylierungsabhängigen Interaktionen auf andere Formen der posttranslationalen Modifikationen, wie Hydroxylierung, Acetylierung und Methylierung erweitert, da auch für sie Proteininteraktionsdomänen gefunden wurden (Pawson und Nash, 2003).

Da viele Proteine mehrere Interaktionsdomänen besitzen und erkennen, sowie auch bestimmte Domänen verschiedene Interaktionen eingehen können, wird die Ausbildung multipler Proteinnetzwerke zur optimalen Signaltransduktion ermöglicht.

1.3. Zelluläre Funktion der Phosphoinositide

Phosphoinositide sind eine Familie von acht Membranlipiden, die alle auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert sind. Aus Phosphatidylinositol können durch Phosphorylierungs-Reaktionen an D3, D4 und D5 Position des Inositolringes die anderen höher phosphorylierten Phosphoinositide gebildet werden. Phosphatidylinositol besteht aus einer myo-Inositol-Kopfgruppe, die über eine Phosphodiester-Bindung mit Diacylglycerol verbunden ist. Die Hydroxylgruppen am C1- und C2-Atom des Glycerins sind typischerweise mit Stearin- und Arachidonsäure verestert. Der Phosphoinositid-Metabolismus wird durch Phosphoinositid-Kinasen und –Phosphatasen katalysiert.

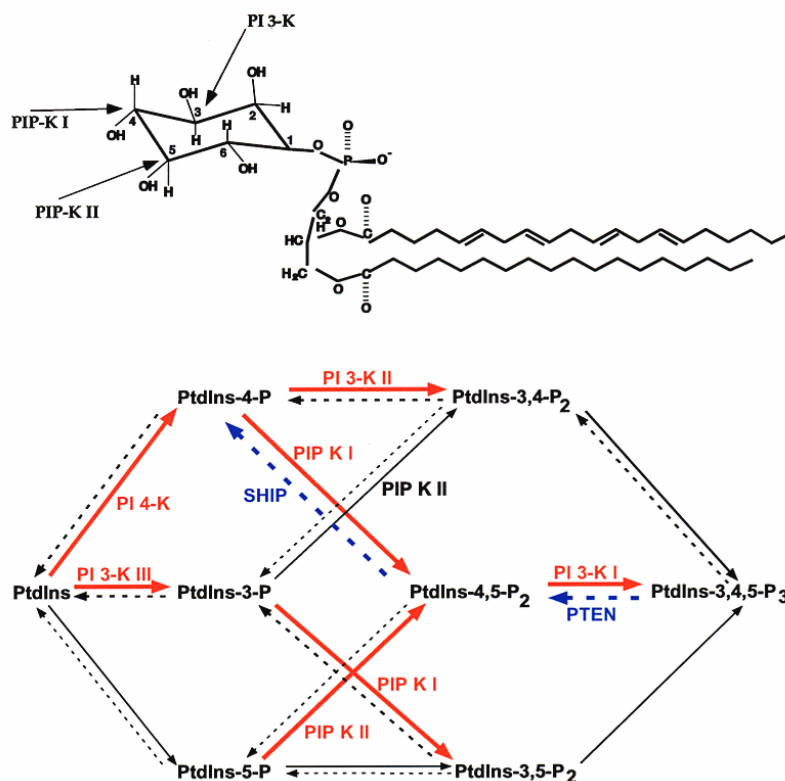


Abb. 2: Phosphatidylinositol und der Phosphoinositid-Metabolismus (aus Toker et al., 2002)

In unstimulierten Zellen kommt von allen Phosphoinositiden das Phosphatidylinositol mit maximal 10 % vom Gesamtlipid der Zellmembranen am häufigsten vor, gefolgt von

10-bis 100-fach niedrigeren PI-4-P- und PI-4,5-P₂-Spiegeln. In Säugerzellen sind die Spiegel von PI-3-P ähnlich denen von PI-5-P, beide liegen 20-bis 50-fach unter denen von PI-4-P und PI-4,5-P₂. PI-3,5-P₂, PI-3,4-P₂ und PI-3,4,5-P₃ sind dagegen in unstimulierten Zellen nicht detektierbar, nach Zellstimulation wird ihre Konzentration jedoch innerhalb von wenigen Sekunden drastisch erhöht. Die Tatsache, dass die Phosphoinositide nur einen geringen Anteil der Gesamtmembranlipide darstellen, weist darauf hin, dass diese Lipide keine strukturellen Funktionen, jedoch schnelle spezifische regulatorische Funktionen ausüben können (Toker, 2002). Es gilt heute als sicher, dass Phosphoinositide in Agonist-stimulierte Signaltransduktionswege der Zelle involviert sind und durch spezifische Interaktionen mit einer Vielzahl von Proteinen Signale wie Zellwachstum, Proliferation, Apoptose, Cytoskelettänderungen, Zellmigration, Insulinwirkung und Vesikelbildung vermitteln können. Dabei binden die Phosphoinositide an spezifische Zieldomänen innerhalb ihrer Effektorproteine, was zur Effektormodulation und anschließenden Signalweiterleitung führt. Die folgende Tabelle zeigt eine Auflistung der Phosphoinositide und Beispiele für bekannte Zieldomänen in vivo.

Phosphoinositid	Zieldomänen in vivo
PI	keine bekannt
PI-3-P	FYVE, PX
PI-4-P	PH
PI-5-P	PHD-Finger
PI-3,4-P ₂	PH
PI-3,5-P ₂	GRAM
PI-4,5-P ₂	PH, ENTH, Tubby, FERM
PI-3,4,5-P ₃	PH, ENTH

Tab. 3: Phosphoinositide und deren Erkennungsdomänen (nach Lemmon, 2003)

PI-3-P kann Transportprozesse innerhalb der Zelle regulieren, so ist z.B. die Bindung von EEA1 an PI-3-P für die Endosomenfusion erforderlich. An der Regulation der Golgi-Funktion ist PI-4-P beteiligt, indem es den AP1-Adapter-Komplex des Golgi-Apparates direkt bindet. Zur Induktion apoptotischer Signalwege kommt es durch die Assoziation von ING 2, dem Produkt eines putativen Tumor-Suppressor-Gens, mit PI-

5-P über eine PHD-Finger-Domäne (Prestwich, 2004). Für PI-3,5-P₂ konnte kürzlich eine Bindung an die GRAM-Domäne von Myotubularin gezeigt werden. Über diese Interaktion reguliert Myotubularin die Funktion der späten Endosomen (Tsujita et al., 2004).

Eine Schlüsselrolle innerhalb der Phosphoinositide nimmt das PI-4,5-P₂, welches als Vorläufer der „second messenger“ IP₃ und DAG bekannt wurde, ein. Beide Botenstoffe entstehen nach Spaltung von PI-4,5-P₂ durch Phospholipase C infolge einer Rezeptorstimulation. Das hydrophile IP₃ bindet am endoplasmatischen Reticulum an IP₃-abhängige Calciumkanäle, was die Kanalöffnung und somit Calcium-Freisetzung zur Folge hat. Die Erhöhung der zellulären Calcium-Konzentration vermittelt z.B. die Kontraktion glatter Muskeln. DAG verbleibt als hydrophobes Molekül in der Plasmamembran und bewirkt hier primär die Stimulation der Proteinkinase C. Diese Proteinkinase ist als zentrales Signalprotein an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse, wie Transkription und Transport, beteiligt. In der Zelle existieren viele Proteine als direkte Effektoren von PI-4,5-P₂, in den meisten Fällen ist ihre Interaktion durch PH-Domänen vermittelt. Eine große Zahl dieser Effektoren reguliert Vesikelbildung, Membranlokalisation sowie Cytoskelettlagerungen. Durch Phosphoinositid-3-Kinasen kann PI-4,5-P₂ zu dem „second messenger“ PI-3,4,5-P₃ weiterphosphoryliert werden. Die lokale Akkumulation von PI-3,4,5-P₃ nach Zellstimulation resultiert in der Rekrutierung von Effektorproteinen, welche direkt über PI-3,4,5-P₃-spezifische PH-Domänen mit der Lipidmembran interagieren können. Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Serin/Threonin-Kinase Akt/PKB, das zelluläre Homolog des viralen Onkogen v-Akt. Die Bindung von PI-3,4,5-P₃ an die PH-Domäne von Akt/PKB induziert eine Konformationsänderung im Enzym, wodurch Thr³⁰⁸ in Akt/PKB für die Proteinkinase PDK1 zugänglich wird und phosphoryliert werden kann. PDK1 hat ebenfalls eine PI-3,4,5-P₃-spezifische PH-Domäne und kann so an die Plasmamembran binden und Akt/PKB aktivieren. Zur vollen Aktivierung muß Akt/PKB noch an Ser⁴⁷³ phosphoryliert werden, was möglicherweise auch durch PDK1 erfolgt, indem das Enzym seine Substratspezifität von Thr³⁰⁸ zu Ser⁴⁷³ ändert (Rameh und Cantley, 1999). Aktivierte Akt/PKB phosphoryliert das proapoptotische BAD und ermöglicht so die Assoziation von BAD mit dem Protein 14-3-3. Diese Assoziation verhindert eine Interaktion mit BCL-XL, welche zur Apoptose führen würde. Auch in Zellen, die BAD nicht exprimieren, kann Akt/PKB das Überleben sichern, indem der Transkriptionsfaktor FKHRL1 durch Akt/PKB phosphoryliert wird. Im

dephosphorylierten Zustand führt FKHRL1 wahrscheinlich über Induktion der Expression apoptoseauslösender Gene zur Apoptose.




Aktivierte Akt/PKB ist auch in der Lage GSK3 und PFK2 zu phosphorylieren und somit Gluconeogenese und Glycolyse zu beeinflussen (Coffer et al., 1998). Neben Akt/PKB binden z.B. auch die Tyrosinkinase Btk, sowie die Austauschfaktoren für GTP-bindende Proteine Grp1 und Vav1 über spezifische PH-domänen an PI-3,4,5-P₃ und führen zu Zellproliferation, Zellmigration und Vesikelbildung (Han et al., 1998; Rameh und Cantley, 1999). Obwohl lange vermutet wurde, dass PI-3,4-P₂ nur das Hydrolyseprodukt von PI-3,4,5-P₃ ist und keine Funktion als echter „second messenger“ hat, konnte vor einigen Jahren gezeigt werden, dass PI-3,4-P₂ mit verschiedenen Proteinen direkt assoziieren kann und somit deren Aktivität und/oder Lokalisation beeinflusst. Der am besten untersuchte Effektor ist auch hier die Akt/PKB-Proteinkinase, deren PH-Domäne die Bindung an PI-3,4-P₂ gegenüber PI-3,4,5-P₃ bevorzugt. Die Bindung erfordert einen konservierten Arg²⁵-Rest in der PH-Domäne von Akt/PKB. Eine Mutation an dieser Stelle hebt sowohl die PI-3,4-P₂/ PI-3,4,5-P₃-Bindung, als auch die mitogene Antwort auf. Die Bindung von PI-3,4-P₂ an Akt/PKB induziert eine geringe, aber reproduzierbare Enzymaktivierung. Die volle und effiziente Akt/PKB-Aktivierung erfordert jedoch noch die Phosphorylierungen durch PDK1 (siehe oben). PDK1 kann auch an PI-3,4-P₂ binden, obwohl in vitro die Affinität zu PI-3,4,5-P₃ wahrscheinlich höher ist. Es gibt Hinweise aus Untersuchungen mit Thrombozyten, in welchen die Akt/PKB-Aktivierung mit einer PI-3,4-P₂-Akkumulation korreliert (Franke et al., 1997). Die PKC-Isoformen δ , ϵ und ζ können in vitro direkt durch PI-3,4-P₂ aktiviert werden. Diese Beispiele zeigen, dass PI-3,4-P₂ auch als „second messenger“ angesehen werden muß (Toker et al., 2002).

1.4. PI-3-Kinasen

1.4.1. Klassifizierung der PI-3-Kinasen

Zur PI-3-Kinase-Familie gehören alle Enzyme, die Phosphoinositide an D3-Position des Inositolringes phosphorylieren können. Auf der Basis ihrer Struktur und Substratspezifität unterteilt man die PI-3-Kinasen in drei Klassen. Klasse I und II wurden nur in Vielzellern gefunden, wohingegen Klasse III auch in Einzellern vorkommt. PI-3-Kinasen translozieren nach der Aktivierung von Membranrezeptoren durch Wachstumsfaktoren

an die Zellmembran und können hier Phosphoinositide phosphorylieren. Die Produkte der PI-3-Kinasen fungieren als „second messenger“, indem sie zelluläre Zielproteine wie beschrieben über bestimmte Interaktionsdomänen binden und/oder aktivieren können. Diese Ereignisse bilden den Start einer Signalkaskade, welche zahlreiche zelluläre Aktivitäten wie Proliferation, Differenzierung, Chemotaxis oder Glucose Homöostase auslöst. Welche dieser zellulären Funktionen vermittelt wird, bestimmen Typ des Stimulus, Isoform der PI-3-Kinase und/oder die Natur der „second messenger“ Lipide.

Klasse	Domänenstruktur	Untereinheiten		Lipid-Substrate	
		Katalytische	Adapter	in vitro	in vivo
I A		p110 α , β , δ	p85 α , β p55 α , γ p50 α	PI PI-4-P PI-4,5-P ₂	PI-4,5-P ₂
I B		p110 γ	p101 p84		
II		PI3KC2 β , γ PI3KC2 α	unbekannt Clathrin	PI PI-4-P (PI-4,5-P ₂)	unbekannt
III		hVps34	p150 (hVps15)	PI	PI

 Ras-Bindungs-Domäne  Helikale Domäne
 C2-Domäne  Katalytische-Domäne

Abb. 3: Klassifizierung der Säuger PI-3-Kinasen

Klasse I PI-3-Kinasen nutzen PI, PI-4-P und PI-4,5-P₂ als in vitro Substrate, bevorzugen aber in vivo PI-4,5-P₂. Alle Mitglieder dieser Familie sind heterodimere Proteine bestehend aus einer p110 katalytischen Untereinheit (~ 120 kDa) und einer regulatorischen Untereinheit (50-100 kDa). Sie sind alle sensitiv gegenüber den PI-3-Kinase-Hemmern Wortmannin (ein potenter zelldurchgängiger Pilzmetabolit) und LY294002, welche an die aktive Seite der katalytischen Untereinheit binden und die Kinase-Aktivität hemmen. In Säugern unterscheidet man basierend auf strukturellen und funktionellen Unterschieden die Subklassen, I A und I B.

Klasse I A PI-3-Kinasen enthalten jeweils eine α , β oder δ Form der p110 Untereinheit und eine regulatorische Untereinheit (z.B. p85 α/β , p55 α/γ , p50 α). Sie werden aktiviert

durch die Assoziation ihrer regulatorischen Untereinheit mit Phosphotyrosinen von aktivierten Tyrosinkinase-Rezeptoren.

Die PI-3-Kinase der Klasse I B kann aus einer p110 γ katalytischen Untereinheit und einer regulatorischen Untereinheit (p101) zusammengesetzt sein. PI-3-Kinase γ assoziiert nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren mit der β/γ -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen.

Charakteristisch für die Klasse II PI-3-Kinasen (PI3K-C2) ist die große Einzelpolypeptidkette (170-210 kDa) dieser Enzyme, welche eine zusätzliche carboxy-terminale C2-Domäne enthält. Diese PI-3-Kinasen können *in vitro* PI und PI-4-P als Substrate nutzen, bevorzugen aber PI. Die PI-3-kinasen PI3K-C2 β und γ scheinen Monomere zu sein, da für sie noch keine Adapterproteine gefunden wurden. Clathrin kann als Adapterprotein an die N-terminale Region von PI3K-C2 α binden und die Substrataffinität dieser PI-3-Kinase ändern, indem es PI3K-C2 α befähigt, PI-4-P und PI-4,5-P₂ als Substrate zu nutzen. Auch in Bezug auf ihre Sensitivität gegenüber dem Inhibitor Wortmannin unterscheiden sich die drei Klasse II PI-3-Kinasen. PI3K-C2 α und β fungieren downstream von Rezeptortyrosinkinasen, Cytokin-Rezeptoren und Integrin-Rezeptoren, was zur Folge hat, dass sie verschiedene zelluläre Funktionen ausüben müssen. Die präzisen zellulären Funktionen dieser Enzymfamilie sind z.Zt. noch unklar.

Die Klasse III PI-3-Kinasen (hvps 34) sind homolog zur einzigen PI-3-Kinase in Hefe, dem Vps 34p. Analog zur Hefe konnte auch in Säugern als Adapterprotein eine Proteinkinase p150 (hvps 15) identifiziert werden, welche für die Regulation der Membran-Assoziation und Enzym-Aktivität verantwortlich ist. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wird nur PI als Substrat genutzt und zu PI-3-P umgesetzt (Toker et al., 2002).

1.4.2. Struktur der Klasse I PI-3-Kinasen

Die katalytischen Untereinheiten der Klasse I PI-3-Kinasen besitzen alle eine Ras-Bindungsdomäne (RBD), eine C2-Domäne, eine Helikale Domäne und eine Katalytische Domäne (Walker et al., 1999; siehe Abb. 3).

Die katalytische Domäne, welche auch als Homologie-Region 1 bezeichnet wird, ist die am höchsten konservierte Domäne der PI-3-Kinasen. Im Falle der PI-3-Kinase γ besteht sie aus einem N-terminalen (Aminosäuren 726-883) und einem C-terminalen (Aminosäuren 884-1092) Bereich. Innerhalb dieser Domäne gibt es verschiedene Strukturähnlichkeiten mit Proteinkinasen, was die in PI-3-Kinasen gefundene

Proteinkinaseaktivität erklärt. Alle Klasse I PI-3-Kinasen zeigen Autophosphorylierung, wobei diese bei der Klasse I A zur Hemmung der Lipidkinaseaktivität führt, aber bei der Klasse I B ohne Effekt auf die Lipidkinaseaktivität ist (Carpenter et al., 1993; Dhand et al., 1994; Vanhaesebroeck et al., 1999 a; Czupalla et al., 2003). Die beiden konservierten Aminosäuren Ser⁸⁰⁶ und Lys⁸³³ der PI-3-Kinase γ interagieren mit den β -bzw. α -Phosphatresten des ATP. Lys⁸³³ kann außerdem den PI-3-Kinasehemmer Wortmannin kovalent binden, was eine komplette Inhibierung sowohl der Lipid- als auch der Protein-Kinaseaktivität zur Folge hat (Stoyanova et al., 1997). Für die Substratspezifität der PI-3-Kinasen ist die Aktivierungsschleife (Aminosäuren 964-988 der p110 γ) im C-terminalen Bereich essentiell. Im Modell wird die Lipid-Kopfgruppe in einem Hohlraum zwischen der C-terminalen Helix $\alpha 12$, der Aktivierungsschleife und der katalytischen Schleife positioniert. Außerdem gibt es zwei potentielle Metallbindungsseiten, wobei Metall I mit dem konservierten Asparagin 951 und Metall II mit den Asparaginsäureresten 836 und 964 der PI-3-Kinase γ interagieren.

Als Homologie-Region 2 wird die Helikale-Domäne, manchmal auch PIK-Domäne genannt, bezeichnet. Diese Domäne kommt nicht nur in allen PI-3-Kinasen, sondern auch in der Familie der PI-4-Kinasen vor. Die Helikale Domäne, welche die Aminosäuren 545-725 der PI-3-Kinase γ umfasst, dient als Rückgrat zur Orientierung der anderen Domänen. Sie setzt sich aus fünf A/B Paaren antiparalleler Helices zusammen und weist somit Strukturähnlichkeit mit sogenannten HEAT-Sequenz-Motiven auf, welche in Protein-Protein-Interaktionen involviert sind (Prasad et al., 2001; Vetter et al., 1999; Groves et al., 1999). Die C2-Domäne bzw. Homologie-Region 3 (Aminosäuren 357-522 der PI-3-Kinase γ) besteht aus acht antiparallelen β -Faltblättern, ähnlich der Typ II C2-Domäne in PLC $\delta 1$. Über drei Schleifen (CBR1-CBR3) an einem Ende der Domäne können C2-Domänen häufig an Phospholipidmembranen binden. Alle PI-3-Kinasen besitzen in ihrer N-terminalen Region eine C2-Domäne. Die PI-3-Kinasen p110 β und p110 δ zeigen eine Häufung basischer Aminosäurereste in ihrer CBR3-Schleife, was bedeutend für die Membranbindung sein könnte. In Analogie zu Enzymen wie PKC oder cytosolischer PLA₂ könnte die C2-Domäne der PI-3-Kinasen an der Membraninteraktion beteiligt sein. Die Membranbindungsoberfläche der PI-3-Kinase γ könnte sich aus den drei Schleifen der C2-Domäne (CBR1-CBR3), der Spalte zwischen dem N- und C-terminalen Bereichen der katalytischen Domäne und der Spitze der Aktivierungsschleife zusammensetzen.

Alle Klasse I PI-3-Kinasen besitzen eine Ras-Bindungsdomäne bzw. Homologie-Region 4, die starke Strukturähnlichkeit mit den Ras-Bindungsdomänen in anderen Ras-Effektorproteinen aufweist. Die Ras-Bindung aller Klasse I PI-3-Kinasen erfolgt GTP-abhängig. Der Austausch von GDP gegen GTP verursacht in zwei Regionen von Ras, bekannt als „switch I“ und „switch II“, einen Konformationswechsel. Dieser Konformationswechsel erlaubt Ras die Bindung und Aktivierung vieler Effektoren. Die Ras-Bindungsdomäne der PI-3-Kinase γ , welche die Aminosäuren 220-311 umfaßt, hat Kontakt zum N-terminalen Bereich der katalytischen Domäne und in geringem Ausmaß auch zum C-terminalen Bereich. Ras bildet einen transienten Komplex mit PI-3-Kinase γ und aktiviert sie *in vivo* und *in vitro*. Strukturstudien zeigen einen direkten Kontakt zwischen der „switch II“-Region der Effektordomäne von Ras und dem C-terminalen Teil der katalytischen Domäne der PI-3-Kinase γ (Pacold, et al., 2000). Die Konformationsänderung der PI-3-Kinase γ nach Ras-Bindung deutet auf eine allosterische Wirkung hin. Die Aktivierung der PI-3-Kinase γ durch Ras ist das Ergebnis einer Erniedrigung des K_m -Wertes für PI-4,5-P₂ sowie einer Erhöhung von V_{max} . Weder *in vivo*- noch *in vitro*-Tests mit Ras-aktivierter PI-3-Kinase γ konnten eine Ras-abhängige Translokation der PI-3-Kinase γ an Lipidmembranen zeigen (Suire et al., 2002). Alle Klasse I A PI-3-Kinasen besitzen noch eine zusätzliche p85-Bindungsdomäne an ihrem N-Terminus, über die sie mit ihren regulatorischen Adapter-Untereinheiten assoziieren können. In Säugern werden verschiedene regulatorische Untereinheiten exprimiert, die von drei Genen (α , β und γ) kodiert werden. Die Untereinheiten p85 α , p55 α und p50 α sind vom gleichen Gen durch alternatives Spleißen hergeleitet (Escobedo et al., 1991; Otsu et al., 1991).

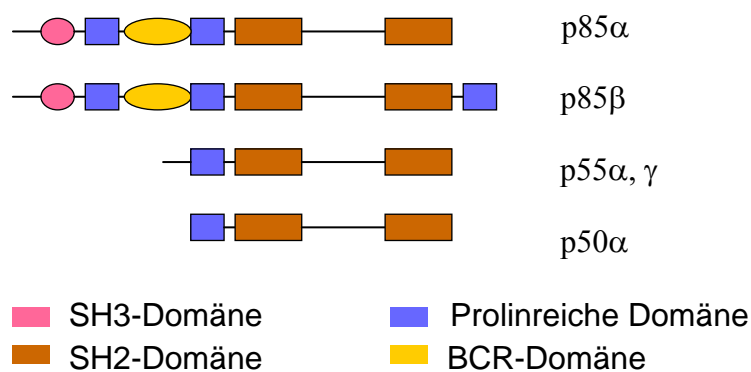


Abb. 4: Domänenstruktur der regulatorischen Untereinheiten der Klasse I A PI-3-Kinasen

Der Prototyp ist die p85 α -Untereinheit, welche aus zwei SH2-Domänen, einer SH3-Domäne, einer BCR-Domäne sowie zwei Prolinreichen Domänen besteht.

Die SH3-Domäne vermittelt Interaktionen zu Proteinen mit prolinreichen Regionen und bildet so einen alternativen Signalmechanismus für die Membranrekrutierung der Klasse I A PI-3-Kinasen. So kann die SH3-Domäne auch mit prolinreichen Motiven innerhalb des p85-Proteins selbst interagieren.

Über die BCR-Domäne assoziiert p85 mit kleinen GTPasen (z.B. Rac und Cdc42) und reguliert deren Aktivität.

Die Aminosäuresequenz zwischen den beiden SH2-Domänen, auch Inter SH2-Domäne genannt, bindet konstitutiv an den N-Terminus der katalytischen Untereinheiten p110 α , p110 β und p110 δ , was zur Erhaltung der Stabilität von p110 in der Zelle, aber auch zur Hemmung der katalytischen Aktivität führt (Wymann and Pirola, 1998). In der Inter-SH2-Domäne ist auch Ser⁶⁰⁸ lokalisiert, dessen Phosphorylierung durch p110 α die Lipidkinase-Aktivität hemmt. Mutationen in diesem Bereich führen neben der Aktivitätshemmung auch zur Erniedrigung der Assoziation von p110 α mit p85 α .

Die beiden SH2-Domänen zeigen hohe Affinität für phosphorylierte Tyrosine in pYXXM-Motiven von Tyrosinkinaserzeptoren, ihren Substraten und Adapterproteinen. Diese Interaktion der SH2-Domäne mit tyrosinphosphorylierten Peptiden hebt die Hemmung der katalytischen Aktivität, hervorgerufen durch die Assoziation von p85 mit p110, auf und bringt das Enzym an die Plasmamembran. Die Tyrosinphosphorylierung der regulatorischen Untereinheit aktiviert die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase. Die C-terminale SH2-Domäne von p85 kann das Enzymprodukt PI-3,4,5-P₃ binden. Die PI-3,4,5-P₃- und Phosphotyrosin-Bindung an die C-terminale SH2-Domäne sind ausschließlich wechselseitig. Eine Umverteilung der PI-3-Kinase an der Plasmamembran, verursacht durch die Verdrängung von Phosphotyrosin durch PI-3,4,5-P₃, ist ein potentieller „Feedback-Mechanismus“ für die Regulation der Enzym-Aktivität.

Die Klasse I B PI-3-Kinase γ besitzt keine p85-Bindungsdomäne (Stephens et al., 1997) und assoziiert auch nicht mit diesen regulatorischen Untereinheiten (Stoyanov et al., 1995). PI-3-Kinase γ kann aber mit einem 101 kDa schweren Protein (p101) interagieren (Stephens et al., 1997), welches keinerlei Homologie zu bisher bekannten Proteinen zeigt (Maier et al., 1999). Große Bereiche von p101 interagieren mit der N-terminalen Hälfte von p110 γ und können die G β γ - Stimulierbarkeit der PI-3-Kinase γ noch verstärken. Für die volle Aktivierung des p101/p110 γ -Komplexes durch G β γ

werden der N- und C-Terminus von p101 benötigt (Krugmann et al., 1999). Es gibt Hinweise, dass p101 die Substratspezifität der G $\beta\gamma$ -stimulierten PI-3-Kinase für PI-4,5-P₂ erhöht (Maier et al., 1999). Die Stimulation der PI-3-Kinase γ durch G $\beta\gamma$ mit PI als Substrat erfolgt aber p101-unabhängig, ebenso wie die Regulation von p110 γ durch den fMLP-Rezeptor (Leopoldt et al., 1998; Kular et al., 1997). In Abwesenheit von G $\beta\gamma$ hat p101 keinen Einfluß auf die Substratspezifität (Maier et al., 1999). Nach Transfektion in HEK-Zellen kann G $\beta\gamma$ über Interaktion mit p101 die PI-3-Kinase γ vom Cytosol an die Membran rekrutieren (Brock et al., 2003). Der N-Terminus von p101 ist verantwortlich für die Heterodimerisierung mit p110 γ und der C-Terminus dient der Bindung an den G $\beta\gamma$ -Komplex. Beide Interaktionsdomänen repräsentieren die höchst konservierten Teile des Proteins innerhalb eines breiten Bereichs von Spezies (Voigt et al., 2005). Kürzlich wurde mit p84, einem 84,3 kDa schweren Protein, ein weiteres Adapterprotein der PI-3-Kinase γ gefunden. Die Bindung von p84 an p110 γ verstärkt ebenfalls die Fähigkeit von G $\beta\gamma$ die PI-3,4,5-P₃-Bildung zu erhöhen. Das p84/p110 γ Heterodimer ist allerdings weniger G $\beta\gamma$ -sensitiv als das p101/p110 γ Heterodimer. Die Adapterproteine p84 und p101 werden von unterschiedlichen Genen kodiert, aber beide Proteine werden bevorzugt in Zellen des Immunsystems exprimiert. Die Identität zwischen p84 und p101 beträgt 30 % und ist primär an den N- und C-terminalen Enden zu finden. Basierend auf seiner Primärstruktur besitzt p84 nur eine geringe Homologie mit p101 und zeigt auch keine erkennbaren Domänen innerhalb seiner Struktur (Suire et al., 2005).

1.4.3. Funktion der Klasse I PI-3-Kinasen

Aufgrund der gleichen Substratspezifität und ähnlichen Struktur der Klasse I PI-3-Kinasen ist es schwierig, die Funktion spezifischer Isoformen aufzuklären. So kam es in den letzten Jahren vor allem zum Einsatz dominant negativer Mutanten und transgener Mäuse, um die verschiedenen, aber möglicherweise überlappenden Funktionen der PI-3-Kinasen, aufzuklären.

Gen-deletierte Knockout-Mäuse, denen p110 α oder p110 β , die beide ubiquitär vorkommen, deletiert wurde, zeigen embryonale Letalität, was ein Hinweis auf die essentielle Natur dieser beiden Isoformen ist (Bi et al., 1999, Bi et al., 2002). Das Fehlen von p110 α führt außerdem zu starken proliferativen Defekten der Tiere, aber zu keiner verstärkten Apoptose (Bi et al., 1999). Die Größe des adulten Herzens wird

ebenfalls von p110 α reguliert, was die Rolle bei Wachstumsprozessen unterstreicht (Shio et al., 2000). Eine Hemmung der PI-3-Kinasen p110 β und p110 δ durch Injektion Isoform-spezifischer Antikörper beeinträchtigt die Lamellipodien-Ausdehnung und die Makrophagen-Migration, wohingegen p110 α -Antikörper zur Hemmung der Zell-Proliferation, aber nicht der Migration von Makrophagen führen (Vanhaesebroeck et al., 1999). Die Involvierung differenter Klasse IA PI-3-Kinase- Isoformen in die Migration scheint Zelltyp-abhängig zu sein (Ridley, A.J., 2001). In Endothelzellen der Schweineaorta, welche p110 α und p110 β , aber nicht p110 δ exprimieren, ist p110 α für die PDGF-induzierte Migration und p110 β für die Insulin-induzierte Migration verantwortlich (Hooshmand-Rad et al., 2000). Für die insulinabhängigen metabolischen Funktionen in Adipozyten ist p110 β , aber nicht p110 α erforderlich (Wang et al., 1998). Mikroinjektion von p110 β - neutralisierenden Antikörpern führt zur Aufhebung des Insulin induzierten Glukosetransports in Adipozyten, wohingegen die Mikroinjektion von Anti-p110 α - Antikörpern nur minimale Effekte zeigt (Asano et al., 2000). Knockout-Mäuse von p110 δ sind lebensfähig und wachsen normal (Wymann et al., 2003, Koyasu, 2004). Die Isoform p110 δ , deren Expression auf Leukozyten beschränkt ist, lässt eine bedeutende Rolle bei der Immunantwort vermuten (Vanhaesebroeck et al., 1997). So zeigen Mäuse nach Deletion des p110 δ -Gens und Mäuse mit funktionell inaktiver p110 δ eine Beeinflussung der B-Zellentwicklung und der B-Zell-Antigen-Rezeptor vermittelten Proliferation, sowie eine verringerte Antikörper-Produktion. Auch die T-Zell-Proliferation kann von p110 δ beeinflusst werden (Okkenhaug et al., 2002, Clayton et al., 2002, Jou et al., 2002). Knockout-Mäuse, denen die regulatorischen Untereinheiten p85 α , p55 α und p50 α fehlen, sterben perinatal an Nekrosen der Leber und des braunen Fettgewebes, sowie Verkalkung des Herzgewebes (Fruman et al., 2000). Dagegen sind sowohl p85 α , als auch p85 β Knockout-Mäuse lebensfähig, zeigen aber Insulinhypersensitivität (Terauchi et al., 1999, Ueki et al., 2002). Auch beeinflusst p85 α die B-Zellentwicklung und die Antikörperbildung, aber nicht die T-Zell-Entwicklung und- Aktivierung (Fruman et al., 1999).

Knockout-Mäuse von p110 γ sind lebensfähig, fruchtbar und wachsen normal, weisen aber Defekte in der Immunabwehr auf (Hirsch et al., 2000, Sasaki et al., 2000a, Li et al., 2000). Sasaki und Mitarbeiter beschreiben außerdem die spontane Bildung von Darmtumoren in p110 γ Knockout-Mäusen (Sasaki et al., 2000b). Dieser Befund steht aber im Widerspruch zu Ergebnissen aus anderen Arbeitsgruppen. Die Analyse von

über 100 Gewebsbiopsien aus p110 γ -Null-Mäusen verschiedenen Alters und Geschlechts zeigte keine malignen Transformationen (Barbier et al., 2001). Die Entwicklung von Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen verläuft in p110 γ -Null-Mäusen normal, trotzdem zeigen die Mäuse funktionelle Defekte (Koyasu et al., 2003). Die Isoform p110 γ , die in Säugerzellen hämatopoetischen Ursprungs stark exprimiert wird, ist in Thrombozyten für die ADP-vermittelte Aggregation sowie die PKB- und die Fibrinogen-Rezeptor-Aktivierung verantwortlich. Im Gegensatz dazu erfolgen die Thrombinantwort und die Regulation der Blutungszeit p110 γ -unabhängig (Hirsch et al., 2001). In Mastzellen ist p110 γ für die Degranulierung in Antwort auf G_i-Protein gekoppelte Rezeptor-Agonisten, wie Adenosin, zuständig (Laffargue et al., 2002). Das Fehlen von p110 γ in T-Zellen führt zur Beeinträchtigung der Thymozytenentwicklung und T-Zell-Aktivierung, wohingegen in B-Zellen weder ein Effekt auf die Zellentwicklung noch auf die Aktivierung nachweisbar ist (Rodriguez-Borlado et al., 2003; Sasaki et al., 2000). In T-Zellen ist p110 γ an der Chemokin-induzierten PKB-Phosphorylierung, der Zellmigration sowie der T-Zell-Polarisation und Aktin-Polymerisation beteiligt (Nombela-Arrieta et al., 2004). Nach Stimulation mit Chemokinen zeigt sich auch eine verringerte Migration von Neutrophilen und Makrophagen in p110 γ Knockout-Mäusen, was die essentielle Rolle der PI-3-Kinase γ bei der Steuerung von Entzündungsreaktionen zeigt (Hirsch et al., 2000; Sasaki et al., 2000). PI-3-Kinase γ spielt aber nicht nur bei der zielgerichteten Migration der Neutrophilen in das entzündete Gewebe eine wichtige Rolle, sondern ist auch im vaskulären Endothel für die Selektin-abhängige Adhäsion der Neutrophilen erforderlich (Puri et al., 2005). Die Bedeutung der PI-3-Kinase γ bei Entzündungsreaktionen konnte auch in zwei differenten Modellen der akuten Pankreatitis gezeigt werden. Auch hier führt der p110 γ -Verlust zur reduzierten Neutrophilen-Infiltration und erniedrigt signifikant den Schweregrad der Acinuszell-Verletzung und-Nekrose (Lupia et al., 2004). In vaskulären glatten Muskelzellen scheint PI-3-Kinase γ die Angiotensin II-abhängige L-Typ Calcium-Kanal-Aktivierung zu kontrollieren (Macrez et al., 2001). Die PI-3-Kinase γ ist in die Angiotensin II-induzierte glatte Muskelkontraktion über zwei verschiedene Signalwege involviert. Einerseits ist PI-3-Kinase γ für die Aktivierung von PKB verantwortlich, die zum verstärkten extrazellulären Ca²⁺-Einlaß über den L-Typ Calcium-Kanal führt. In einem zweiten Signalweg kommt es über PI-3-Kinase γ -Aktivität zur Rac-Aktivierung und

der anschließenden Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, welche die Muskelkontraktion auslösen (Vecchione et al., 2005). Im Herzen ist PI-3-Kinase γ ein Negativ-Regulator der Herzkontraktion, da PI-3-Kinase γ Knockout-Mäuse eine verstärkte Kontraktionsfähigkeit zeigen (Crackower et al., 2002). PI-3-Kinase γ -Knockout-Mäuse zeigen unter Stressbedingungen massive Herz-Nekrosen. Mäuse, in denen p110 γ inaktiviert ist, weisen immunologische Defekte analog den Knockout-Mäusen auf, zeigen aber keine erhöhte Herzkontraktion und entwickeln keine Herzgewebeschäden nach Drucküberlastung (Patrucco et al., 2004). Dies zeigt, dass PI-3-Kinase γ im Herzen an verschiedenen Signalwegen beteiligt ist. Die kinaseabhängige Aktivität kontrolliert PKB- und MAPK-Aktivierung, was zu Herzfibrose und Hypertrophie führen kann. Die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ führt zur Bildung von PI-3,4,5-P₃ und der damit verbundenen Aktivierung von PKB, wohingegen die Proteinkinase-Aktivität zur Induktion des MAPK-Signalweges zu Erk ausreicht (Bondeva et al., 1998). Diese Signalwege (PKB und MAPK) können auch durch andere PI-3-Kinase Isoformen geschaltet werden. Die kinaseunabhängige Aktivität wird über eine direkte Protein-Protein Interaktion ausgeübt. Katalytisch inaktive PI-3-Kinase γ kann in Herzmyozyten über direkte Wechselwirkung mit der cAMP-abhängigen Phosphodiesterase (PDE3B) eine Enzymaktivierung und somit eine Erniedrigung der cAMP-Spiegel bewirken. Die cAMP-Erniedrigung führt zur Hemmung der PKA-abhängigen Phosphorylierungen von Phospholamban, Troponin I und dem L-Typ Calcium Kanal im Herzen, was zur Verringerung der Kontraktionsfähigkeit der Herzmuskelzellen führt (Vanhaesebroeck et al., 2004). PI-3-Kinase γ kontrolliert die Herzfunktion durch Erniedrigung der cAMP-Konzentration unabhängig von G-vermittelten Signalwegen (Alloatti et al., 2005).

1.4.4. Membranassoziationsmöglichkeiten der Klasse I PI-3-Kinasen

Die Rekrutierung der katalytischen Untereinheiten der Klasse I A PI-3-Kinasen an tyrosinphosphorylierte Proteine an der Plasmamembran erfolgt über die regulatorischen Untereinheiten, wie oben beschrieben. Die Membranbindung von p110 durch p85 hat zwei Effekte auf die katalytischen Untereinheiten. Zum einen wird p110 in die Nähe der Inositol-Lipid-Substrate gebracht und zum anderen wird die katalytische Aktivität von p110 erhöht, wenn p85 an Tyrosin-phosphorylierte Proteine bindet.

Im Gegensatz dazu ist der Membranbindungsmechanismus der Klasse I B PI-3-Kinasen noch ungeklärt. Prinzipiell gibt es für die Membranbindung cytosolischer Proteine, wie PI-3-Kinase γ , die Möglichkeit der Protein-Protein-Interaktion oder die Bindung der Proteine an Lipidmembranen. Diese Vorgänge setzen das Vorhandensein von Interaktionsdomänen im Protein voraus.

Die als regulatorische Untereinheiten der PI-3-Kinase γ diskutierten Proteine p101 und p84 enthalten keine SH2- und SH3-Domänen als Rezeptorbindungs-Mechanismus, noch andere bekannte Membranbindungsdomänen (Walker et al., 1999). Das erst kürzlich entdeckte p84 ist bisher nur in Zellen des Immunsystems detektiert worden (Suire et al., 2005). Auch die zellulären Expressionsmuster von p110 γ und p101 zeigen deutliche Unterschiede (Wetzker, 2004). Der Komplex von p110 γ mit p101 kann in Herzmyozyten und Mastzellen nicht nachgewiesen werden (Tornay et al., 2003; Patrucco et al., 2004). Procko und McColl zweifeln eine p101-Funktion bei der p110 γ Neutrophilen-Chemotaxis an (Procko und McColl, 2005). Auch nach Retinsäure-induzierter Expressions- und Aktivitäts-Erhöhung der PI-3-Kinase γ (2-10-fach) in U937-Zellen bleibt p101 unverändert (Baier et al., 1999). G $\beta\gamma$ kann direkt an p110 γ binden (Leopoldt et al., 1998), aber eine direkte Beteiligung der G-Proteine bei der unmittelbaren Translokation der PI-3-Kinase γ an die Membran ist nicht nachweisbar (Krugmann et al., 2002; Brock et al., 2003). Myristinsäure- und Farnesylsäure-Ketten allein sind nicht ausreichend für eine feste Membranbindung von Proteinen (Wedegaertner, 1998). Ras bindet und aktiviert p110 γ über die Ras-Bindungsdomäne der PI-3-Kinase, ohne daß es dabei zu einer Membrantranslokation der PI-3-Kinase γ kommt (Pacold et al., 2000; Suire et al., 2002). Die Helikale Domäne der PI-3-Kinase γ zeigt Strukturähnlichkeit zu HEAT-Sequenzmotiven (Walker et al., 1999), die in Protein-Protein-Interaktionen involviert sind (Vetter et al., 1999; Groves et al., 1999), aber bisher sind noch keine potentiellen Bindungspartner für PI-3-Kinase γ beschrieben worden. Die C2-Domäne der PI-3-Kinase γ kann an multilamellare Phospholipidvesikel binden (Walker et al., 1999), so dass eine Membranbindung der PI-3-Kinase γ über diese und/oder andere noch unbekannte Phospholipidbindungs-Domänen denkbar wäre.

2. Zielstellung der Arbeit

Klasse I PI-3-Kinasen sind cytosolische Enzyme, deren Substrate (Phosphoinositide) sich aber auf der Innenseite der Plasmamembran befinden, so dass sie zur Substratphosphorylierung an die Plasmamembran binden müssen. Für die Klasse I A PI-3-Kinasen ist der Membranbindungsmechanismus aufgeklärt und oben beschrieben. Im Gegensatz dazu ist die Membranbindung der Klasse I B PI-3-Kinasen, besonders in Abwesenheit von p101, noch völlig unklar. Umfassendere Untersuchungen, die der Frage einer möglichen direkten Bindung der PI-3-Kinase γ an Lipidmembranen nachgehen, fehlen bisher. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Bindung der PI-3-Kinase γ an Membranen sowohl in vitro als auch in vivo zu untersuchen, um die Möglichkeit einer Plasmamembranbindung der PI-3-Kinase γ über direkte Lipidassoziation zu diskutieren. Bei den Versuchen zur Bindung des Enzyms an Phospholipid-Vesikel sollte die Präferenz für bestimmte Phospholipide, der Einfluß der Fettsäureketten (gesättigt/ungesättigt) sowie der Mechanismus der Bindung (ionische/hydrophobe Wechselwirkung) untersucht werden.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Phospholipide

POPC: PC aus Eigelb, enthält primär Palmitin-und Ölsäure

DPPC: PC mit Dipalmitinsäure

SAPC: PC mit Stearin-und Arachidonsäure

DPPA: PA mit Dipalmitinsäure

SAPA: PA mit Stearin-und Arachidonsäure

DPPE: PE mit Dipalmitinsäure

LPPE: PE mit Linol-und Palmitinsäure

DPPS: PS mit Dipalmitinsäure

SOPS: PS aus Rinderhirn, enthält primär Stearin-und Ölsäure

PI: PI aus Rinderleber, enthält primär Stearin-und Arachidonsäure

PI-4-P: aus Rinderhirn, enthält primär Stearin-und Arachidonsäure

PI-4,5-P2: aus Rinderhirn, enthält primär Stearin-und Arachidonsäure

SADAG: DAG mit Stearin-und Arachidonsäure

Phosphoinositid-Mix (PS, PI, PIP und PIP2)

Zur Bestimmung der PI-3-Kinase γ -Aktivität wurde ein Phospholipidextrakt aus Sojabohnen verwendet, welcher ca. 50% PI enthält.

Alle genannten Phospholipide wurden von Sigma gekauft.

Rhodamin-PE wurde von Avanti-Polar Lipids gekauft.

3.1.2. Zelllinien und Medien

293: humane embryonale Nierenfibroblasten

U937: humanes histiocytisches Lymphom

Sf 9: Ovarialzellen von *Spodoptera frugiperda*

Alle Zellkulturmedien und Medienzusätze wurden von Gibco BRL, Eggenstein, bezogen.

Fötale Kälberserum wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren für 30 min bei 56 °C inkubiert.

Medium für HEK 293-Zellen:

90 % DMEM

1 mg/ml Glukose

10 µg/ml Gentamycin

10 % FKS

2 mM Glutamin

Medium für U937-Zellen:

90 % RPMI 1640

10 % FKS

Medium für Sf 9-Zellen:

90 % Sf-900 II SFM

10 % FKS

3.1.3. Antikörper

Anti-GST-Antikörper (polyklonal) von Santa Cruz

Anti-PI-3-Kinase γ -Antikörper (polyklonal)

Anti-PI-3- Kinase γ -Antikörper (monoklonal) von Herrn Prof. Dr. R. Wetzker

Meerrettichperoxidase gekoppelt an Anti-Kaninchen-IgG von Santa Cruz

Meerrettichperoxidase gekoppelt an Anti-Maus-IgG von Santa Cruz

3.1.4. Rekombinante Baculoviren

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten rekombinanten Baculoviren erhielten wir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. R. Wetzker, Medizinische Fakultät der FSU Jena.

3.1.5. Radioaktiv markierte Substanzen

(γ -³²P)ATP

NEN Life Science Products

3.1.6. Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid

BioRad

Aprotinin

Sigma

ATP	Sigma
ATRA	Sigma
Ammoniumperoxidisulfat	BioRad
Bromphenolblau	Serva
β -Mercaptoethanol	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G-250	Promega
Dimethylsulfoxid	Merck
Dithiothreitol	Sigma
EDTA	Serva
EGTA	Serva
Essigsäure	Merck
Ethanol	Sigma
Glutathion, reduziert	Sigma
Glycerin	Merck
Glycin	Merck
HCl	Merck
HEPES	Serva
Hexan	Merck
Inositol-1,4,5-trisphosphat	Sigma
Leupeptin	Sigma
Magnesiumchlorid	Sigma
Methanol	Fluka
Natrium- β -Glycerophosphat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumorthovanadat	Sigma
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumfluorid	Sigma
Pepstatin	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma
Propanol	Roth
Rinderserum-Albumin	Sigma
SDS	Sigma

SDS-PAGE, Standardproteine	BioRad
TEMED	BioRad
Tris	Serva
Triton X-100	Merck
Tween 20	Serva
Wortmannin	Sigma

3.1.7. Puffer

Laemmli-Puffer:	6 % SDS
(Probenpuffer)	15 % β -Mercaptoethanol
	30 % Glycerin
	0,01 % Bromphenolblau
	187 mM Tris/HCl, pH 6,8
Tris-Glycin-SDS :	25 mM Tris
(Laufpuffer für	192 mM Glycin
SDS-PAGE)	1 % SDS
Blot-Puffer :	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	20 % Methanol
PBS, pH 7,4:	130 mM NaCl
	10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$
Tritonlyse-Puffer:	50 mM HEPES, pH 7,5
(für U937-und	150 mM NaCl
HEK 293-Zellen)	10 % Glycerol
	50 mM NaF
	1 % Triton X-100
	1 mM PMSF
	1 mM Natriumorthovanadat
	1 μM Pepstatin

Hypotoner Lysepuffer:	10 mM HEPES, pH 7,0 1 mM EGTA 10 mM Natrium- β -Glycerophosphat 1 mM PMSF 0,5 mM DTT 2 mM Natriumorthovanadat 2 μ g/ml Aprotinin 1 μ g/ml Leupeptin 1 μ M Pepstatin
Lipidbindungs-Puffer:	10 mM HEPES, pH 7,4 100 mM NaCl 0,5 mM EGTA
Tritonlyse-Puffer: (für Sf 9-Zellen)	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1 % Triton X-100 5 mM EDTA 1 mM NaF 1 mM PMSF 2 μ g/ml Aprotinin 1 μ g/ml Leupeptin 10 mM Benzamidin 1 mM Natriumorthovanadat
PIK-Puffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM NaCl 0,5 mM EGTA
Glycerolpuffer:	50 mM HEPES, pH 7,5 50 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 70 % Glycerol 1 mM DTT

3.1.8. Sonstiges

Glutathion-Sepharose 4B	Pharmacia
Protein A-Sepharose	Sigma
ECL- Western Blotting Detection System	Amersham
Entwickler	Kodak
Nitrocellulose-Membran	Amersham
Filme	Kodak
Szintillationsflüssigkeit	Roth
Filterpapier 3 MM	Whatman
Pierce BCA Protein Assay	Pierce

Die Peptide: 925; KILIKNKK

929; KCKVMASKKK sind von BioTeZ Berlin-Buch GmbH

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkulturen

Sf 9-Zellen wurden bei 28 °C ohne CO₂-Zufuhr kultiviert, wohingegen HEK-293- und U937-Zellen bei 37 °C unter CO₂-Zufuhr (HEK 293: 7 % CO₂; U937: 5 % CO₂) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert wurden. Alle drei Zelllinien wurden in Abhängigkeit von ihrer Zelldichte aller drei bis vier Tage im Verhältnis 1:5 bis 1:10 umgesetzt. Die nicht fest adhärenen Sf 9- und U937-Zellen konnten direkt mit Medium verdünnt werden, wohingegen die HEK 293-Zellen erst mit Trypsin/EDTA in Suspension gebracht werden mussten, bevor sie mit Medium verdünnt werden konnten. Unter den genannten Bedingungen betrug die Verdopplungszeit für Sf 9- und HEK 293-Zellen ca. 20-24 Stunden und für U937-Zellen ca. 30-40 Stunden. HEK 293-Zellen, die mit PI-3-Kinase γ transfiziert waren (diese Zellen wurden uns freundlicherweise von Dr. Dietrich Scheglmann zur Verfügung gestellt), wurden zur Selektion gegenüber Zellen ohne Fremd- DNS in Kulturmedium zuzüglich G418 (200 µg/ml) gehalten.

Das Einfrieren und Auftauen dieser drei Zellkulturen erfolgte nach der gleichen Vorschrift. Zum Einfrieren wurden die in Lösung gebrachten Zellen, nach Zellzählung in der Neubauerkammer, für 5 min bei 4 °C und 500 x g abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellsedimente in eiskaltem Medium mit 10 % DMSO aufgenommen und

über Nacht in die $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ Gefriertruhe gestellt. Am nächsten Tag konnten die Zellen dann zur längeren Aufbewahrung in den Flüssigstickstofftank überführt werden.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstofftank geholt und sofort in ein Wasserbad von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ gestellt. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurden sie in ein 15 ml Gefäß überführt und tropfenweise mit 10 ml vorgewärmten Medium versetzt. Um die DMSO-Reste aus dem Einfriermedium zu entfernen, erfolgte eine Zentrifugation der Zellen bei $200 \times g$ für 5 min. Die sedimentierten Zellen wurden in 10 ml frischem Medium aufgenommen, in Gewebekulturflaschen überführt und zur Kultivierung in die geeigneten Inkubatoren gestellt.

3.2.2. Expression rekombinanter GST-Fusionsproteine in Sf 9-Zellen

Sf 9-Zellen sind eine der am häufigsten verwendeten Insekten-Zelllinien zur Expression rekombinanter Säugerproteine. Für die Proteinexpression werden die Sf 9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren infiziert. Der Vorteil dieser Proteinexpression gegenüber der in Bakterienzellen ist, dass in den meisten Fällen lösliche und korrekt gefaltete Proteine exprimiert werden, die auch funktionell aktiv sind. Außerdem sind Sf 9-Zellen, im Gegensatz zu Bakterienzellen, zu verschiedenen posttranslationalen Modifikationen, wie Glykosylierung, Phosphorylierung, Acetylierung und limitierter Proteolyse, fähig. Da man leicht präparative Mengen an rekombinanten Protein gewinnen kann und die Verdopplungszeiten dieser Zellen bei 20 Stunden liegen, besitzt die Expression in Sf 9-Zellen auch Vorteile gegenüber Säuger-Transfektionssystemen.

Infektion von Sf 9-Zellen

Zur Infektion wurden $4,5 \times 10^7$ Zellen in eine 175 cm^2 Zellkulturflasche gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur stengelassen, bevor die Zugabe des entsprechenden rekombinanten Virus (5-10 Viren pro Zelle) erfolgte. Die rekombinanten Viruslösungen mit bekanntem Virustiter wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. R. Wetzker zur Verfügung gestellt. Die transfizierten Zellen wurden dann unter Normalbedingungen weiterkultiviert. Nach 72 Stunden konnte aus diesen Zellen das rekombinante Protein nach Tritonlyse der Zellen isoliert werden.

3.2.3. Zellaufschlüsse und Fraktionierung

Tritonlyse

Bei der Tritonlyse löst das nichtionische Detergenz Triton X-100 die Zellmembranen auf und setzt dabei cytosolische und membranständige Proteine frei. Nur Kernproteine und fest an das Cytoskelett assoziierte Proteine werden nicht in Lösung gebracht.

Kontrollversuche zeigten, dass PI-3-Kinase γ aus Sf 9- und U937-Zellen durch Triton X-100 komplett in Lösung gebracht wird, d.h. im Lysat enthalten ist.

Zur Tritonlyse wurden die Sf 9- und U937-Zellen, nach Zellzählung in der Neubauer-kammer, abzentrifugiert und anschließend wurden die Zellpellets einmal mit PBS gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden auf Eis gestellt und sofort in eiskaltem Lysepuffer resuspendiert ($1,5 \times 10^7$ Sf 9-Zellen/ml Lysepuffer und $2,5 \times 10^7$ U937-Zellen/ml Lysepuffer) und eine Stunde auf Eis inkubiert, wobei die Ansätze aller fünf Minuten geschüttelt wurden. Anschließend wurden die Sf 9-Zellansätze für 30 Minuten bei 4 °C und 32000 x g in der Sorvall-Zentrifuge und die U937-Zellansätze 15 Minuten bei 4 °C und 21000 x g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände entsprachen den Tritonlysaten, welche je nach Verwendungszweck (Reinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine für die in vitro-Untersuchungen, Immunopräzipitation der PI-3-Kinase γ) sofort weiterverarbeitet wurden. Die Sedimente, welche die Kerne und das Cytoskelett enthielten, wurden verworfen.

Hypotone Lyse und Fraktionierung

Die in Lösung gebrachten Zellen wurden, nach Zellzählung in der Neubauer-kammer, abzentrifugiert und einmal mit PBS für 5 min bei 500 x g gewaschen. Anschließend wurden die gewaschenen Zellen in eiskalten hypotonen Lysepuffer aufgenommen (1×10^8 Zellen /ml) und für 30 Minuten im Eis inkubiert, bevor die Zellsuspensionen zur vollständigen Lyse der Zellen 20x gepottert wurden. Zur Beseitigung von Zellpartikeln und Kernen wurden die Ansätze für 10 min bei 1000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden zur Gewinnung von Cytosol- und Membranfraktionen in der Ultrazentrifuge bei 4 °C und 135000 x g für 90 Minuten zentrifugiert. Die Überstände nach der Ultrazentrifugation entsprachen den Cytosol- und die Sedimente den Membranfraktionen. Nur die Proteine der Cytosolfraktionen waren im Puffer gelöst, wohingegen die Proteine der Membranfraktionen sowie der Kern- und Partikelfraktionen (bei Bedarf)

erst noch durch Zugabe analoger Volumina an Tritonlysepuffer (s.o. Tritonlyse) in Lösung gebracht werden mussten.

3.2.4. Reinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine

Die Reinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine erfolgt über Affinitätschromatographie, indem das GST eine reversible Bindung mit matrixgebundenem Glutathion eingeht.

Für die in vitro-Untersuchungen wurden die Tritonlysate der Baculovirus-infizierten Sf 9-Zellen mit mehrfach in Lysepuffer gewaschener Glutathion-Sepharose 4B für zwei Stunden bei 4 °C unter Schütteln inkubiert, nachdem 3 ml Lysat auf 50 µl Glutathion-Sepharose-Matrix gegeben wurden. Anschließend wurde nicht gebundenes Protein durch zweimaliges Waschen mit Lysepuffer entfernt. Zur Tritonentfernung wurde noch viermal mit PIK-Puffer gewaschen. Die Waschungen erfolgten alle bei 4 °C und 500 x g für jeweils 5 min. Für kurze Zeit konnten die matrixgebundenen GST-Fusionsproteine im Kühlschrank aufbewahrt werden und zur längeren Lagerung wurden sie in Glycerolpuffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.2.5. Immunopräzipitation

Zur Immunopräzipitation wurden neben Tritonlysaten auch Cytosol- und Membranfraktionen eingesetzt. Von den Cytosol- und Membranfraktionen wurden immer analoge Volumina verwendet, um einen direkten Vergleich der PI-3-Kinase γ -Mengen und Aktivitäten bei den anschließenden Untersuchungen zu ermöglichen. Die Fraktionen oder Lysate wurden über Nacht im Kühlraum mit polyklonalem Anti-PI-3-Kinase γ -Antikörper auf dem Drehrad inkubiert. Zur Kontrolle, um unspezifische Bindungen von Proteinen an Protein A-Sepharose auszuschließen, wurde jeweils ein Ansatz ohne Antikörper mitgeführt. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von Protein A-Sepharose zu allen Ansätzen und die Inkubation wurde für zwei Stunden auf dem Drehrad fortgesetzt. Anschließend wurden die Ansätze 5 min bei 4 °C und 1000 x g zentrifugiert und die Überstände mit den ungebundenen Proteinen abgenommen. Diese Überstände dienten zur Überprüfung, ob PI-3-Kinase γ komplett immunopräzipitiert werden konnte. Die Sepharosesedimente mussten zur vollständigen Tritonentfernung und damit alle Fraktionen im gleichen Puffer vorliegen, noch mehrmals mit PIK-Puffer bei 4 °C und 1000 x g für 5 min gewaschen werden. Die so gewaschenen Proben

konnten nun direkt in den Lipidkinase-Aktivitätstest eingesetzt werden oder wurden zur Identifizierung der gebundenen PI-3-Kinase γ über SDS-PAGE und Immunoblot mit Laemmli-Puffer versetzt.

3.2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Dieses diskontinuierliche Elektrophoresesystem unter Verwendung von Tris-Glycin-Puffern wurde von Laemmli (Laemmli, 1970) entwickelt. Die SDS-PAGE ist eine denaturierende Elektrophorese zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht. Das im Probenpuffer (Laemmli-Puffer) enthaltene β -Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrücken und hebt somit Zusammenlagerungen von Protein-Untereinheiten über Disulfidbindungen auf. Das anionische Detergenz SDS denaturiert nicht nur die Proteine, sondern verleiht ihnen auch eine stark negative Ladung. Dies ermöglicht eine Auftrennung der Proteine nur nach ihren Molmassen, nahezu unabhängig von der Faltung und Eigenladung der Proteine. Die diskontinuierliche Elektrophorese zeichnet sich durch ein großporiges Sammelgel zur Konzentrierung der Proteine und ein kleinporiges Trenngel zur Auftrennung der Proteine aus. Da die PI-3-Kinase γ mit einem Molekulargewicht von ca. 120 kDa ein relativ großes Protein ist, wurde ein Trenngel von 7,5 % Acrylamid und ein Sammelgel von 4 % verwendet.

	<u>Sammelgel</u>	<u>Trenngel</u>
Acrylamid/Bisacrylamid		
(30 %/ 0,8 %)	4 % (w/v)	7,5 % (w/v)
Tris/HCl	125 mM; pH 6,8	375 mM ; pH 8,8
SDS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)
TEMED	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
APS	0,05 % (w/v)	0,05 % (w/v)

Die mit Laemmli-Puffer versetzten Proben (3.2.5.) wurden 5 min bei 100 °C hitzedenaturiert und anschließend, nach kurzer Abkühlung, in die Geltaschen des Sammelgels pipettiert. Zur Molekulargewichtskontrolle wurden Proteinstandards mitgeführt.

Die gelelektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte im Tris-Glycin-SDS-Puffer bei einer Spannung von 200 V. Es wurde eine Mini Protean Elektrophorese-Apparatur von BioRad verwendet.

3.2.7. Protein-Färbungen von SDS-Polyacrylamidgelen

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können über verschiedene Färbemethoden, die alle eine Protein-Fixierung und –Färbung beinhalten, im Gel sichtbar gemacht werden. Wir wählten für größere Proteinmengen (>200 ng/ Bande) die Coomassiefärbung und für geringe Proteinmengen (<200ng/ Bande) die wesentlich empfindlichere Silberfärbung.

Coomassiefärbung

Unmittelbar nach der SDS-PAGE wurden die Gele für mindestens 15 min in die Coomassielösung gelegt. Die Coomassielösung, welche sich aus 0,05 % (w/v) Coomassie R250 in 45 % (v/v) Methanol und 9 % (v/v) Essigsäure zusammensetzte, enthielt neben dem Farbstoff Coomassie R250 ein Methanol/Essigsäure-Gemisch zur Fixierung der Proteine. Anschließend mußte das Gel noch entfärbt werden, da die Coomassielösung nicht nur die Proteinbanden anfärbte, sondern auch in das Polyacrylamidgel diffundierte. Als Entfärber wurde ein Gemisch aus 10 % (v/v) Essigsäure und 30 % (v/v) Methanol verwendet. Die Entfärbung erfolgte nach Sicht, indem mehrfach neue Entfärberlösung auf das Gel gegeben wurde, bis nur noch die Proteine als blaue Banden sichtbar waren.

Silberfärbung

Bei der Silberfärbung erfolgten Fixierung und Färbung der Proteine in unterschiedlichen Schritten. Die Gele wurden sofort nach dem Elektrophoreselauf für mindestens 30 min in die Fixierlösung gelegt, welche sich aus 25 % (v/v) Isopropanol und 10 % (v/v) Essigsäure zusammensetzte. Nach der Fixierung erfolgte die Quervernetzung der Proteine in einer 5 % igen (v/v) Glutaraldehydlösung für 30 min. Im Anschluß daran wurden die Gele dreimal für jeweils 10 Minuten mit 20 % (v/v) Ethanol gewaschen und dann 30 Minuten unter reduzierenden Bedingungen in einer 32 mM DTT-Lösung behandelt. Es folgte eine ebenfalls 30 minütige Inkubation in 0,1 % (w/v) AgNO₃ und anschließend musste die Silbernitratlösung schnell mit Wasser abgewaschen werden. Nachdem das Wasser wieder vollständig entfernt war, wurde der alkalische Entwickler (3 % (w/v) Na₂CO₃ und 0,02 % (v/v) Formaldehyd) zugegeben. Die Entwicklung erfolgte nach Sicht und die Reaktion wurde durch Neutralisation (Zugabe von 2,3 M Citronensäure) gestoppt.

3.2.8. Immunoblotting

Immunoblotting beinhaltet den Transfer der Proteine eines Gels auf eine Blotmembran einschließlich der Immunoreaktion zum spezifischen Nachweis von Proteinen.

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine eines Minigels (8x10 cm) wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Towbin et al., 1979). Der Transfer erfolgte in einer Semidry-Blotapparatur von BioRad mit Blot-Puffer über 90 min bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm². Zur Darstellung der übertragenen Proteine erfolgte eine 10 minütige Ponceau-Rot-Färbung der Nitrocellulose-Membran mit 0,1 % Ponceau S in 0,1 % Essigsäure. Danach wurde die Membran solange mit deionisiertem Wasser gespült bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Um eine spätere Molekulargewichtsbestimmung der PI-3-Kinase γ zu ermöglichen, wurde die Position der Standardproteine markiert. Vor der Antikörper-Reaktion wurden alle freien Proteinbindungsstellen der Blotmembran bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde mit 5 % (w/v) Milchpulver in PBS mit 0,1 % (w/v) Tween blockiert. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit 1:200 in Blockierungslösung verdünnten monoklonalen Anti-PI-3-Kinase γ -Antikörper aus der Maus. Nach fünfmaligem Waschen der Membran für jeweils fünf Minuten in PBS mit 0,1 % (w/v) Tween wurde für eine Stunde der 1:5000 in Blockierungslösung verdünnte Anti-Maus IgG –Peroxidase gekoppelte Antikörper zugegeben. Überschüssiger ungebundener Antikörper wurde wieder durch mehrere Waschungen (analog oben) beseitigt. Die Peroxidase-Aktivität ließ sich über Chemilumineszenz-Reaktion (ECL-Kit) nachweisen, wobei die Peroxidase das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol oxydierte. Durch Auflegen eines Röntgen-Films auf die Membran ließ sich die Chemilumineszenz des Oxidationsproduktes detektieren. Die Signalstärke war abhängig von der Expositionszeit des Röntgenfilmes und betrug meist ca. eine Minute.

3.2.9. Lipidbindungstest

Herstellung fluoreszenzmarkierter Mischliposomen

Die in organischen Lösungsmitteln gelösten Phospholipide wurden entsprechend der gewünschten Mischliposomen-Konzentration zusammenpipettiert, dabei war die Rhodamin-PE Menge immer 1 Mol %. Die organischen Lösungsmittel konnten unter N₂-Strom verdampft werden und der getrocknete Lipidfilm wurde in Lipidbindungs-

puffer aufgenommen, so dass eine Endkonzentration von 1 mg/ml erreicht wurde. Durch Vortexen und Homogenisieren konnten die Lipide in Dispersion gebracht werden und blieben noch 30 min bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wurden die Lipide für mindestens 15 min in die $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ Gefriertruhe gestellt. Nach dem Auftauen wurden die Lipide sofort 3x 2 min mit jeweils 1 min Pause im Eisbad mit dem Ultraschallgerät UP50H (Dr. Hielscher GmbH) bei 100 % Intensität beschallt, um kleine unilamellare Vesikel zu erhalten. Diese Mischliposomen konnten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für maximal zwei Tage aufbewahrt werden. Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Liposomenlösungen, zur Beseitigung möglicher Aggregate, für 10 min bei $20000 \times g$ zentrifugiert. Die elektronenmikroskopische Analyse der so hergestellten Mischliposomen, die freundlicherweise von Dr. Walter Richter (Medizinische Fakultät der FSU Jena) durchgeführt wurde, zeigte einheitlich unilamellare Vesikel mit einer durchschnittlichen Größe von 10-30 nm.

Die unter 4.2.3.4. eingesetzten fluoreszenzmarkierten Mischliposomen wurden analog hergestellt, aber der getrocknete Lipidfilm wurde anstelle von Lipidpuffer in Zellkulturmedium aufgenommen.

Bindungstest

Für den Lipidbindungstest wurden 0,1 ml 50 % Glutathion-Sepharose mit 0,1 nMol immobilisiertem GST-Fusionsprotein in Lipidbindungspuffer gemischt und mit 0,1 ml fluoreszenzmarkierter Mischliposomen zusammen für eine Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze dreimal mit je 1 ml Lipidbindungspuffer gewaschen, um ungebundene Liposomen zu entfernen. Die Quantifizierung der Liposomenbindung erfolgte durch Fluoreszenzmessung der gewaschenen Glutathion-Sepharose in schwarzen 96-Loch Mikrotiterplatten bei 390 und 590 nm als Exzitations- und Emissions-Wellenlängen. Der Fluoreszenzwert des GST allein wurde als Blindwert von allen Werten abgezogen.

3.2.10. Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität

Der Aktivitätstest beruht auf der Messung des quantitativen Einbaus des $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -Phosphatrestes des $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP in das als Substrat angebotene PI. Während der Inkubation von Enzym, PI und $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP entstehen $\text{PI-}^{32}\text{P}$ und ADP. Durch anschließende Extraktion kann das radioaktive Phosphoinositid vom unverbrauchten γ -

^{32}P -ATP getrennt werden (nach Wetzker et al., 1991). Die gemessene Radioaktivität der organischen Lipidphase entspricht der Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ . Die Lipidkinase-Aktivität wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 μl , welches sich aus 25 μl Enzymlösung, 10 μl PI-Liposomen und 15 μl Mg-ATP-Lösung zusammensetzte, bestimmt. Die PI-Liposomen wurden wie unter 3.2.9. beschrieben hergestellt, enthielten aber kein Rhodamin-PE, sondern bestanden nur aus 1 mg/ml Phospholipidextrakt aus Sojabohnen mit 50 % PI. Außerdem wurde der getrocknete Lipidfilm nicht in Lipidbindungspuffer, sondern in 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 100mM NaCl und 0,5 mM EGTA aufgenommen. Pro Testansatz waren neben den PI-Liposomen 1 μCi γ - ^{32}P -ATP, 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,5 mM EGTA, 8 mM MgCl_2 und 40 μM ATP enthalten. Der Aktivitätstest wurde durch Zugabe der Mg-ATP-Lösung gestartet und 15 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Durch Zugabe von 0,2 ml 2 M KCl/konz.HCl (8:0,25, v/v) und 1 ml Hexan/Isopropanol (13:7, v/v) wurde die Reaktion beendet. Die Reaktionsgefäße wurden geschüttelt und zur Phasentrennung stehengelassen. In 0,5 ml vorgelegte 0,1 M HCl wurden 0,5 ml der oberen organischen Phase pipettiert. Nach erneuter Phasentrennung wurden 0,2 ml der organischen Phase mit 2 ml Szintillator vermischt und zur Radioaktivitätsmessung in das Szintillationsmeßgerät (Tricarb 2700TR, Canberra Packard) gestellt. Zur Kontrolle wurden immer Ansätze ohne Enzymlösung, nur mit Puffer, mitgeführt.

Zur Überprüfung der gebildeten Phospholipide, was besonders wichtig bei den Aktivitätstests aus Immunopräzipitaten war, wurde immer ein Aliquot der organischen Phase parallel zur Szintillationsmessung in der Dünnschichtchromatographie (Hegewald, 1996) aufgetrennt. Hierzu wurden 20x20 cm HPTLC-Dünnschichtplatten (Kieselgel 60) durch Eintauchen in 5 % Borsäure in Methanol imprägniert. Nach Trocknung der Platten erfolgte der Lipidauftrag mit dem Auftraggerät Linomat IV (CAMAG) und anschließend der Chromatographielauf in der mit dem Laufmittel Propylacetat/ Isopropanol/ Ethanol/ 5 % NH_4OH in H_2O (4+10+3+10) gesättigten CAMAG-Kammer. Die Platten wurden nach dem Lauf getrocknet und die mitgeführten Referenzlipide konnten durch Eintauchen der Platten in 6 % CuSO_4 / 8 % H_3PO_4 – Lösung und 15 min Erhitzen bei 180 °C sichtbar gemacht werden. Die autoradiographische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Phospho-Imagers.

3.2.11. Bestimmung der Proteinkinase-Aktivität

Beim Proteinkinase-Aktivitätstest kommt es zum Einbau des γ - ^{32}P -Phosphatrestes des γ - ^{32}P -ATP in phosphorylierbare Aminosäuren der PI-3-Kinase γ (wahrscheinlich Serine nach eigenen Untersuchungen und Czupalla et al., 2003). Die Bestimmung der Proteinkinase-Aktivität erfolgte prinzipiell wie die Lipidkinase-Aktivitätsbestimmung (3.2.11), aber meist in Abwesenheit von Phospholipiden. Die Inkubationszeit betrug im Gegensatz zum Lipidkinase-Aktivitätstest 30 min und wurde durch Zugabe von Laemmli-Puffer gestoppt. Die Proben wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und nach Gel Trocknung wurde ein Röntgenfilm aufgelegt oder die Proben wurden am Phospho-Imager ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1. In vitro-Untersuchungen

4.1.1. Bindung der PI-3-Kinase γ an die Substrat-Phospholipide

Ein charakteristisches Merkmal aller Klasse I PI-3-Kinasen ist ihre Fähigkeit, die Phosphoinositide PI, PI-4-P und PI-4,5-P₂ an D3-Position des Inositolringes zu phosphorylieren. Für die PI-3-Kinase γ zeigten Stephens und Mitarbeiter erstmals diese Lipidkinase-Aktivität (Stephens et al., 1994). Untersuchungen zur Bindung der PI-3-Kinase γ an ihre Substratlipide gab es jedoch nicht. Aus diesem Grund wurde zuerst die Bindung aller Substrate (PI, PI-4-P und PI-4,5-P₂) an PI-3-Kinase γ mit gemischten Liposomen, welche unterschiedliche Molanteile an Phosphoinositiden und POPC enthielten, getestet.

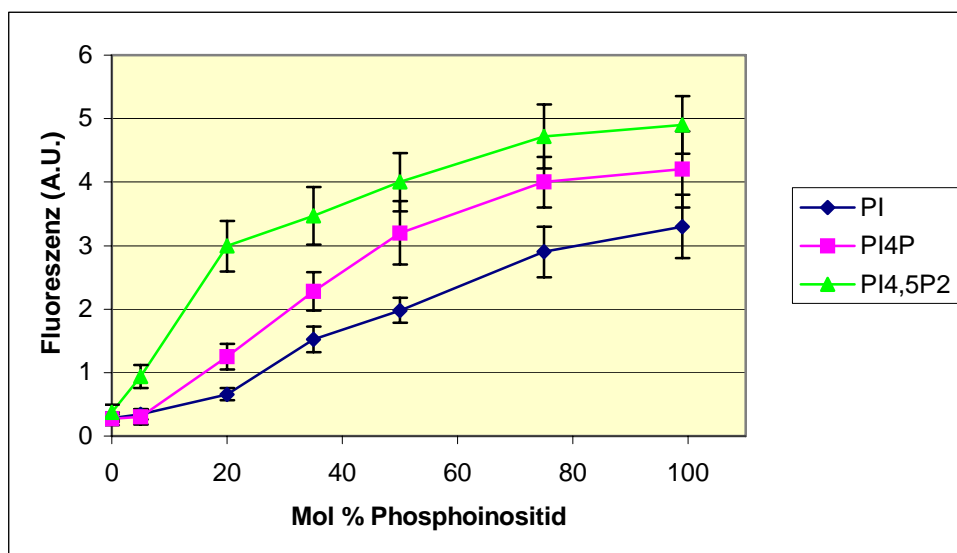


Abb. 5: Bindung der PI-3-Kinase γ an ihre Substrat-Phospholipide

Gereinigte PI-3-Kinase γ (GST/p110 γ) wurde mit fluoreszenzmarkierten Mischliposomen, welche Substratphosphoinositid und POPC in unterschiedlichen Molanteilen enthielten, inkubiert. Der Molanteil der Phosphoinositide betrug 0 bis 99 Mol %. Der Bindungstest wurde entsprechend den Angaben unter Materialien und Methoden durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen.

Alle Substrate binden umso stärker, je höher ihr Molanteil in den Liposomen ist. Die Bindung steigt mit dem Phosphorylierungsgrad der Substrate, PI zeigt die schwächste und PI-4,5-P₂ die stärkste Bindung. Zugabe von Mg-ATP zum Bindungstest führt zur

Phosphorylierung der Phosphoinositide in D3-Stellung des Inositolringes, aber nicht zu Änderungen im Ausmaß der Liposomenbindung (Daten nicht gezeigt).

4.1.2. Bindung der PI-3-Kinase γ an Nicht-Substrat-Phospholipide

Walker und Mitarbeiter entwickelten ein Modell für die PI-4,5-P₂-Bindung an PI-3-Kinase γ (Walker et al., 1999). Nach diesem Modell scheinen die negativen Phosphatreste des PI-4,5-P₂ über ionische Wechselwirkungen an basische Aminosäuren der PI-3-Kinase γ zu binden. Über ionische Wechselwirkungen könnten aber auch andere Phospholipide an PI-3-Kinase γ binden. Deshalb wurde die Bindung der PI-3-Kinase γ an die Nicht-Substrat-Phospholipide PE, PC, PA und PS überprüft.

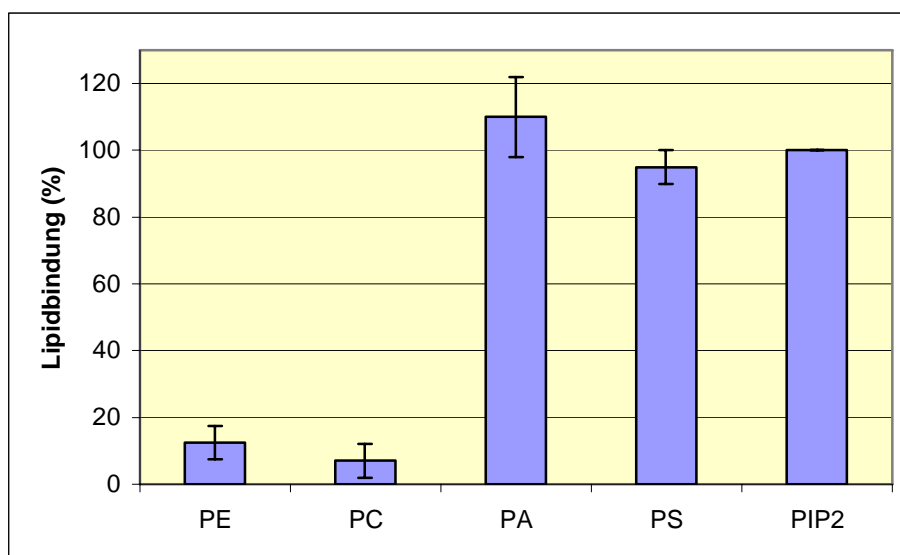


Abb.6 : Bindung der PI-3-Kinase γ an Nicht-Substrat-Phospholipide

Gereinigte PI-3-Kinase γ (GST/p110 γ) wurde mit fluoreszenzmarkierten Mischliposomen, welche 35 Mol% der Phospholipide in POPC oder 99 Mol% POPC enthielten, inkubiert. Der Bindungstest wurde wie unter Materialien und Methoden beschrieben durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen. Das Fluoreszenzsignal der Bindung von PIP₂ (35 Mol% PI-4,5-P₂ in POPC) wurde 100 % gesetzt.

Die neutralen Phospholipide PE und PC zeigen nur eine sehr schwache Bindung, wohingegen die negativ geladenen Phospholipide PA und PS annähernd die gleiche Bindung wie PI-4,5-P₂ zeigen. PI-3-Kinase γ kann demzufolge neben ihren Substraten auch die negativ geladenen Phospholipide PA und PS binden.

4.1.3. Untersuchungen zur Charakterisierung der PI-3-Kinase γ -Phospholipid-Bindung

4.1.3.1. Bedeutung ionischer Wechselwirkungen

Bindet PI-3-Kinase γ die negativ geladenen Phospholipide über ionische Wechselwirkungen, dann müssten steigende Ionenstärken diese Bindung behindern. Deshalb wurde die Bindung der PI-3-Kinase γ an neutrale und saure Lipide in Anwesenheit von 0,1-1 M NaCl gemessen.

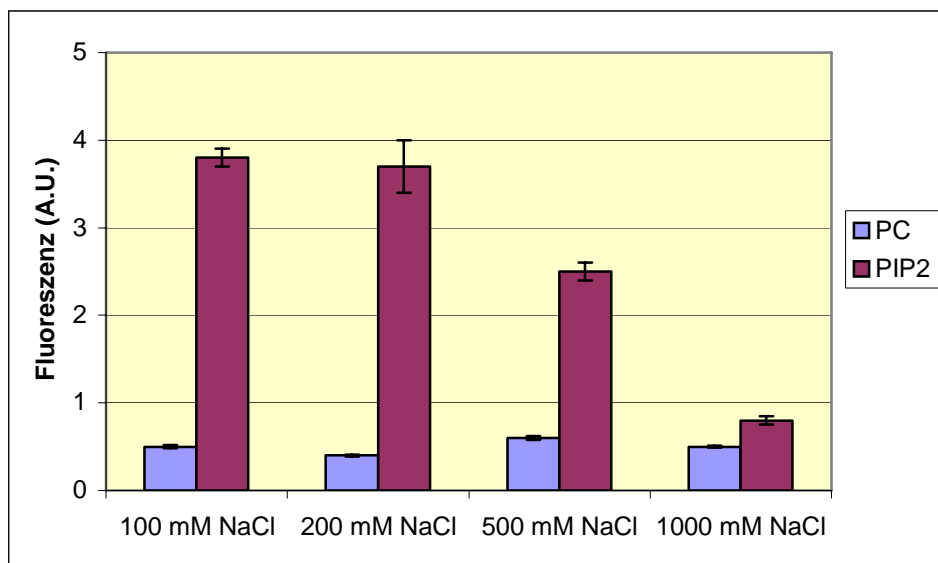


Abb.7: Bindung von PC und PIP₂ an PI-3-Kinase γ in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration

Gereinigte PI-3-Kinase γ (GST/p110 γ) wurde mit fluoreszenzmarkierten Mischliposomen, welche 35 Mol% PI-4,5-P₂ in POPC oder 99 Mol% POPC enthielten, in Anwesenheit von 100, 200, 500 und 1000 mM NaCl inkubiert. Der Lipidbindungstest wurde wie unter Materialien und Methoden beschrieben durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen.

Das neutrale PC zeigt, wie in Abb.6, nur eine schwache Bindung an PI-3-Kinase γ , die sich auch nicht in Abhängigkeit von der Salzkonzentration verändert. Dagegen zeigt PIP₂ eine starke Bindung bei annähernd physiologischen Salzkonzentrationen (100 und 200 mM NaCl). Bei Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 500 mM kommt es zu einer deutlichen Abnahme der Bindung und bei 1000 mM NaCl ist die Bindung nahezu vergleichbar mit der von PC. Auch alle anderen sauren Lipide, welche an PI-3-Kinase γ binden, zeigen bei steigender Salzkonzentration eine Erniedrigung ihrer Bindung analog

dem PIP_2 . Das neutrale PE verhält sich analog dem neutralen PC und zeigt eine von der Salzkonzentration unabhängige, nur sehr schwache Bindung (Daten nicht gezeigt).

4.1.3.2. Testung potentiell kompetitiver Bindungspartner

Nach dem Modell von Walker und Mitarbeitern (Walker et al., 1999) ist eine Konkurrenz zwischen IP_3 und PI-4,5-P_2 um dieselbe Bindungsstelle denkbar. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurde PI-3-Kinase γ mit unterschiedlichen IP_3 -Konzentrationen vorinkubiert und anschließend wurde die PI-4,5-P_2 -Bindung gemessen.

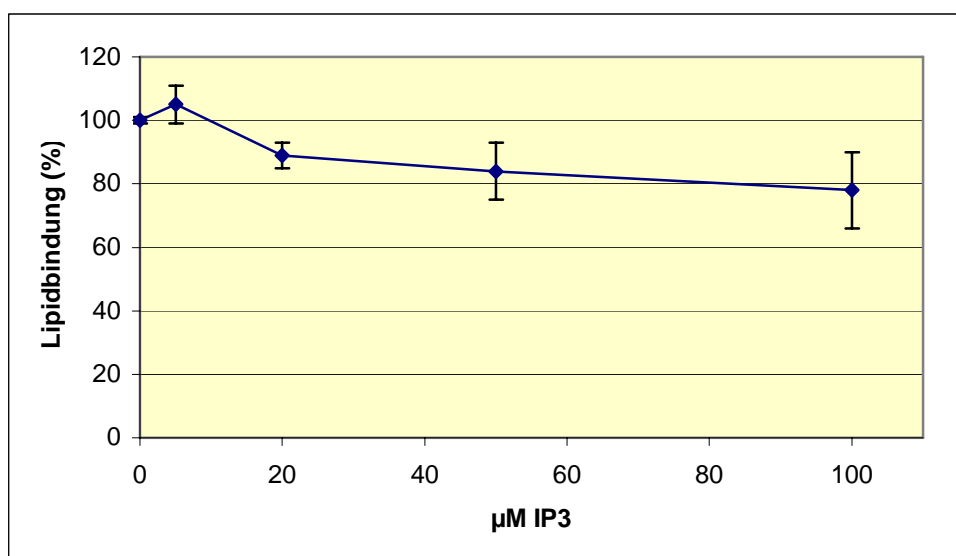


Abb. 8: Einfluß der IP_3 -Vorinkubation auf die PI-4,5-P_2 -Bindung an PI-3-Kinase γ

Gereinigte PI-3-Kinase γ (GST/p110 γ) wurde mit 0, 5, 20, 50 und 100 $\mu\text{M IP}_3$ für 30 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden fluoreszenzmarkierte Mischliposomen mit 5 Mol% PI-4,5-P_2 in POPC allen Tests zugesetzt. Der weitere Bindungstest erfolgte entsprechend den Angaben unter Materialien und Methoden. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen. Die Lipidbindung ohne IP_3 -Zusatz wurde 100 % gesetzt.

Die IP_3 -Vorinkubation zeigt nur einen geringen Einfluß auf die PI-4,5-P_2 -Bindung. Ab einer IP_3 -Konzentration von 20 μM ist eine Abnahme der PI-4,5-P_2 -Bindung an PI-3-Kinase γ (ca. 10 %) zu sehen, die bei der höchsten IP_3 -Konzentration (100 μM) ca. 20 % erreicht.

Peptide mit basischen Aminosäureabschnitten können Phosphoinositide binden, so ist z.B. die Aminosäuresequenz $\text{K}^{457}\text{ILIKNKK}^{464}$ der PLC- $\beta 2$ für die PI-4,5- P_2 -Bindung des Enzyms verantwortlich (Simoes et al., 1995). Auch innerhalb der Kinasedomäne der PI-3-Kinase γ befindet sich ein lysinreicher Sequenzabschnitt mit $\text{K}^{800}\text{CKVMASKKKK}^{809}$. Diese beiden lysinreichen Sequenzabschnitte könnten mit PI-3-Kinase γ um die PI-4,5- P_2 -Bindung konkurrieren. Um dies zu überprüfen, wurden unterschiedliche Konzentrationen der Peptide $\text{K}^{457}\text{ILIKNKK}^{464}$ (Peptid 925) und $\text{K}^{800}\text{CKVMASKKKK}^{809}$ (Peptid 929) mit PI-4,5- P_2 vorinkubiert. Anschließend wurde PI-3-Kinase γ zugesetzt und die PI-4,5- P_2 -Bindung an das Enzym gemessen.

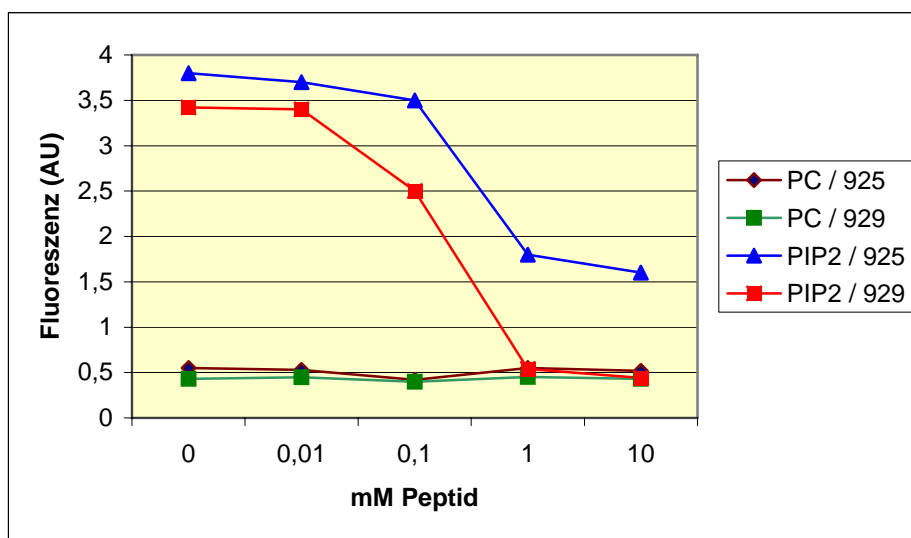


Abb. 9: Einfluß positiv geladener Peptide auf die Bindung von PC und PI-4,5- P_2 an PI-3-Kinase γ

Die fluoreszenzmarkierten Mischliposomen, welche 35 Mol% PI-4,5- P_2 in POPC oder 99 Mol% POPC enthielten, wurden mit 0; 0,01; 0,1; 1 und 10 mM Peptid 925 und 929 für 30 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurde gereinigte PI-3-Kinase γ (GST/p110 γ) allen Tests zugesetzt. Der weitere Bindungstest erfolgte entsprechend den Angaben unter Materialien und Methoden. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen.

PC zeigt, unabhängig von den zugesetzten Peptiden und deren Konzentrationen, nur eine geringe Bindung an PI-3-Kinase γ . Vorinkubation von PI-4,5- P_2 mit dem Peptid 925 aus der PLC- $\beta 2$ -Sequenz führt ab einer Peptidkonzentration von 1mM zu einer Erniedrigung der PI-3-Kinase γ -Bindung um ca. 50 %. Annähernd die gleiche

Bindungshemmung erreicht man auch bei einer Erhöhung der Peptidkonzentration auf 10 mM. Das Peptid 929 aus der PI-3-Kinase γ -Sequenz bewirkt dagegen schon ab einer Konzentration von 0,1 mM eine Erniedrigung der PI-3-Kinase γ -Bindung um ca. 25 % und ab 1 mM eine nahezu komplette Aufhebung der PI-4,5-P₂-Bindung an PI-3-Kinase γ . Die Versuche bestätigen, dass beide lysinreichen Peptide PI-4,5-P₂, aber nicht PC binden und somit in Konkurrenz zur PI-3-Kinase γ -PI-4,5-P₂-Bindung treten können. Das Peptid aus der PI-3-Kinase γ -Sequenz hat offensichtlich eine höhere Affinität zu PI-4,5-P₂ als die lysinreiche Sequenz aus der PLC- β 2.

4.1.3.3. Untersuchungen zur Stabilität des PI-3-Kinase γ -Phospholipid-Komplexes

Um die Art der Bindung zwischen PI-3-Kinase γ und den Phospholipiden weiter zu charakterisieren, wurde die Stabilität des PI-3-Kinase γ -Phospholipid-Komplexes unter verschiedenen Bedingungen getestet. Dazu wurde der Komplex mit Lösungen gewaschen, die ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen stören können. Veränderungen der Ionenstärke oder des pH-Wertes sollten in der Lage sein, ionische Interaktionen aufzulösen. Auch der Einfluß von IP₃ wurde getestet, obwohl nach den in Abb.8 gezeigten Ergebnissen PI-4,5-P₂ die vermutlich höhere Affinität zur PI-3-Kinase γ hat. Da aber auch hydrophobe Wechselwirkungen bei der PI-3-Kinase γ -Phospholipidbindung eine Rolle spielen könnten, wurde zusätzlich der Einfluß des Detergens Triton X-100 getestet. Die Ergebnisse sind in Abb.10 gezeigt.

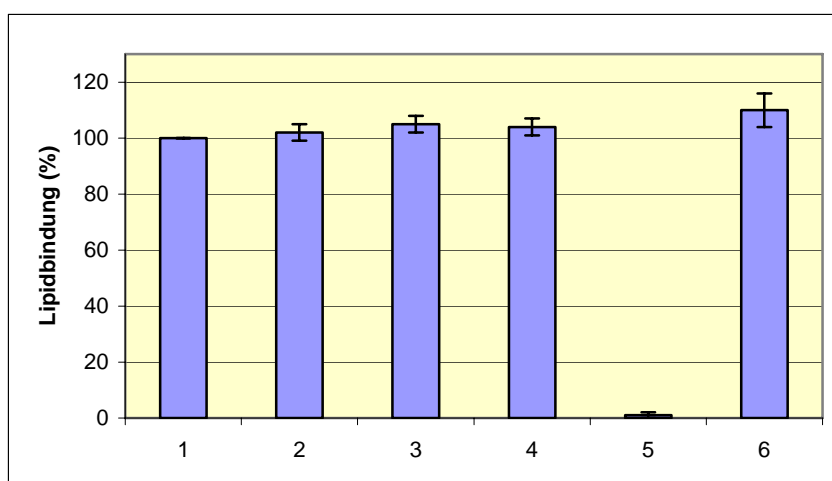


Abb.10: Bindung von PI-4,5-P₂ an PI-3-Kinase γ nach verschiedenen Waschungen des Enzym-Phospholipid-Komplexes

Gereinigte PI-3-Kinase γ (GST/p110 γ) wurde mit fluoreszenzmarkierten Mischliposomen, die 35 Mol% PIP₂ in POPC enthielten, inkubiert. Anschließend wurde der Lipid-Protein-Komplex mit folgenden Puffern gewaschen:

- 1: Kontrolle, Waschung mit Lipidbindungspuffer (100 mM NaCl, pH=7,4)*
- 2: Waschung mit Lipidbindungspuffer; pH=5,0*
- 3: Waschung mit Lipidbindungspuffer ; 1 M NaCl statt 100 mM*
- 4: Waschung mit 100 μ M IP₃ im Lipidbindungspuffer*
- 5: Waschung mit 1 % Triton X-100 im Lipidbindungspuffer*
- 6: Waschung analog 5 und nach Tritonentfernung erneuter PI-4,5-P₂-Bindungsversuch an PI-3-Kinase γ und anschließend Waschung mit Lipidbindungspuffer (100 mM NaCl, pH=7,4)*

Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen. Das Fluoreszenzsignal der PI-4,5-P₂-Bindung an PI-3-Kinase γ nach Waschung mit Lipidbindungspuffer ohne Modifikationen (1; Kontrolle) wurde 100 % gesetzt.

Weder Waschungen mit Lösungen hoher Salzkonzentration (1 M NaCl), saurem pH-Wert (pH=5,0) oder mit IP₃-Zusatz (100 μ M) können PI-3-Kinase γ von den PI-4,5-P₂ haltigen Liposomen ablösen. Nur der Einsatz des Detergenz Triton X-100 (1 %) führt zur kompletten Aufhebung der PI-4,5-P₂-Bindung an PI-3-Kinase γ . Nach Tritonentfernung kann PI-4,5-P₂ wieder gebunden werden, was auf eine wesentliche Rolle hydrophober Wechselwirkungen bei der PI-3-Kinase γ -Phospholipid-Bindung hinweist.

4.1.3.4. Einfluß der Fettsäureketten der Phospholipide auf die PI-3-Kinase γ -Bindung

Da an der Bindung zwischen PI-3-Kinase γ und anionischen Phospholipiden neben elektrostatischen Interaktionen vermutlich auch hydrophobe Wechselwirkungen beteiligt sind, könnten die Fettsäureketten der Phospholipide die Bindung an PI-3-Kinase γ beeinflussen. Neutrale und saure Lipide, die ausschließlich gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren enthielten, wurden deshalb auf ihre Bindungsfähigkeit an PI-3-Kinase γ getestet. Die Ergebnisse sind in Abb.11 dargestellt.

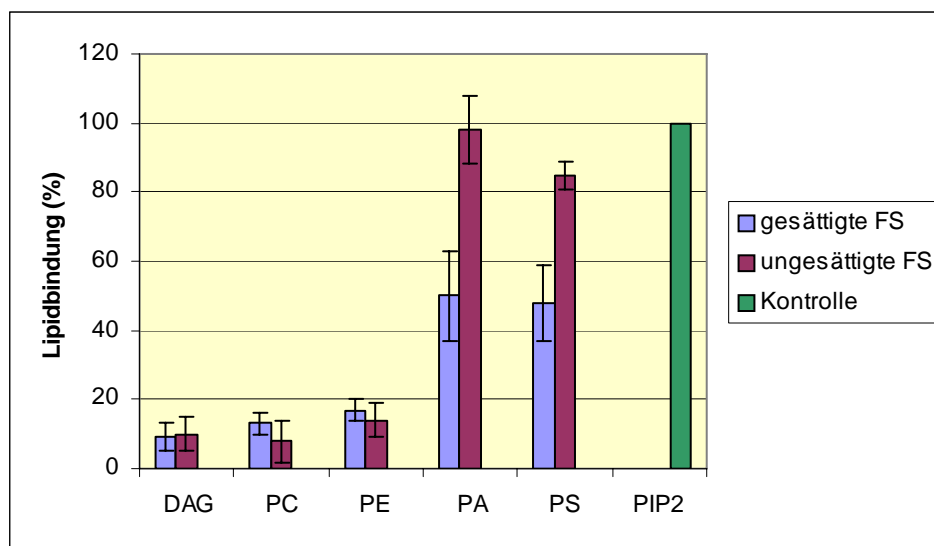


Abb.11: Einfluß der Fettsäureketten der Lipide auf die Bindung an PI-3-Kinase γ
Gereinigte PI-3-Kinase γ (GST/p110 γ) wurde mit fluoreszenzmarkierten Mischliposomem, welche 35 Mol% der Phospholipide oder 20 Mol % DAG mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren in POPC enthielten, inkubiert. Der Bindungstest wurde wie unter Materialien und Methoden beschrieben durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen. Das Fluoreszenzsignal der Bindung mit PIP₂ (35 Mol% PI-4,5-P₂ in POPC) wurde 100 % gesetzt.

Die neutralen Lipide DAG, PC und PE zeigen nur eine geringe Bindung, die unabhängig von der Fettsäurezusammensetzung ist. Dagegen zeigen die stark bindenden sauren Lipide PA und PS einen Bindungsunterschied an PI-3-Kinase γ in Abhängigkeit von der Art der Fettsäuren. Saure Phospholipide mit ungesättigten Fettsäuren binden stärker als Lipide mit ausschließlich gesättigten Fettsäuren.

4.1.4. Beziehung zwischen Phospholipid-Bindung und Enzym-Aktivitäten

4.1.4.1. Lipid-und Proteinkinase-Aktivität in Anwesenheit von Phospholipiden

Da neben den Substratlipiden auch die negativ geladenen Phospholipide PA und PS an PI-3-Kinase γ binden, könnte deren Anwesenheit im Lipidkinasetest möglicherweise die Enzym-Aktivität beeinflussen. Um dies zu überprüfen, wurde die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ in Anwesenheit der Phospholipide PA, PS, PE und PC getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 dargestellt.

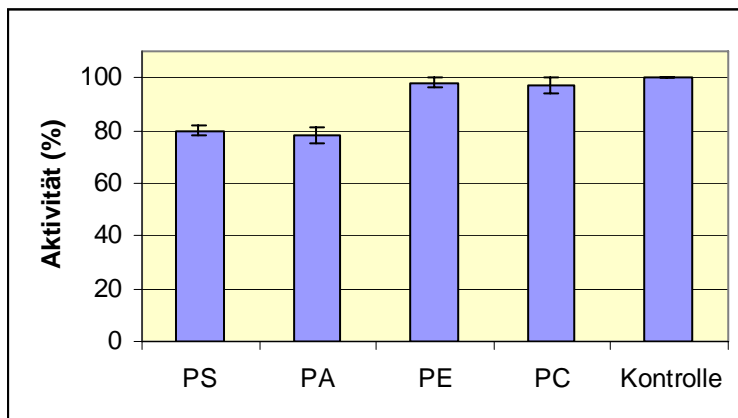


Abb.12: Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ in Anwesenheit von Nicht-Substrat-Phospholipiden

Gereinigte PI-3-Kinase γ (GST/p110 γ) wurde in Anwesenheit der Nicht-Substrat-Phospholipide PS, PA, PE und PC auf ihre Lipidkinase-Aktivität getestet. Die Nicht-Substrat-Phospholipide wurden als Mischliposomen mit 35 Mol% Phospholipid in POPC oder als reine POPC-Liposomen zusammen mit den Substrat-Liposomen zugesetzt. Der Lipidkinase-Aktivitätstest erfolgte entsprechend den Angaben unter Materialien und Methoden. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen. Die Lipidkinase-Aktivität ohne Zusatz von Nicht-Substrat-Phospholipid (Kontrolle) wurde 100 % gesetzt.

Die Anwesenheit der nahezu nicht bindenden Phospholipide PC und PE hat keinen Einfluß auf die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ . Dagegen bewirken die PI-3-Kinase γ bindenden Phospholipide PA und PS eine Erniedrigung der PI-3-Kinase γ -Aktivität um ca. 20 %. Die Bindung von PA und PS an PI-3-Kinase γ erfolgt offenbar in Konkurrenz zu den Substrat-Phospholipiden.

Nach dem Modell von Walker und Mitarbeitern (Walker et al., 1999) liegen die ATP- und Phosphoinositid-Kopfgruppen-Bindungsstellen in unmittelbarer Nachbarschaft. Demzufolge ist es denkbar, dass die Anwesenheit von Phosphoinositiden die ATP-Bindung und somit die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ beeinflussen könnte. Da die Phospholipide PA und PS vermutlich mit den Phosphoinositiden um die Bindung an PI-3-Kinase γ konkurrieren, wäre auch ein Einfluß von PA und PS auf die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ denkbar. Aus diesem Grund wurde getestet,

ob die Anwesenheit des Substrat-Phosphoinositides PI-4,5-P₂ oder des Phospholipides PA Einfluß auf die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ zeigt, indem diese Phospholipide dem Proteinkinasetest zugesetzt wurden.

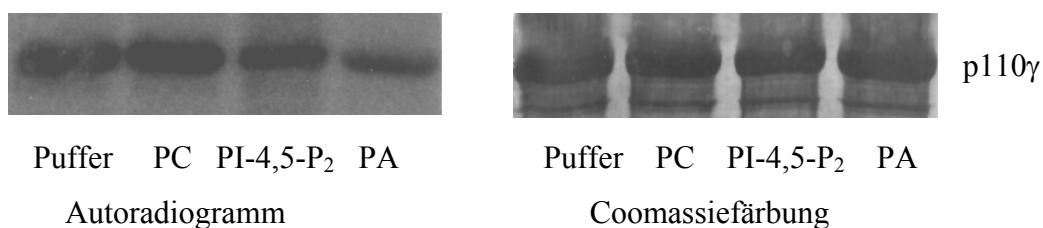


Abb. 13: Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ in Anwesenheit verschiedener Phospholipide

Gereinigte PI-3-Kinase γ (GST/p110 γ) wurde auf den Einbau von radioaktiv markiertem ³²P-Phosphat in Ab- und Anwesenheit von verschiedenen Phospholipiden untersucht. Dargestellt sind ein Coomassie-gefärbtes Proteingel der affinitätschromatographisch gereinigten PI-3-Kinase γ sowie ein repräsentatives Autoradiogramm. Die Bestimmung der Proteinkinase-Aktivität erfolgte entsprechend den Angaben unter Materialien und Methoden.

In Anwesenheit von PC zeigt PI-3-Kinase γ annähernd die gleiche Proteinkinase-Aktivität wie in Abwesenheit von Phospholipid (Puffer- bzw. Kontroll-Ansatz). Die PI-3-Kinase γ bindenden Phospholipide PI-4,5-P₂ und PA dagegen führen zu einer deutlichen Erniedrigung der PI-3-Kinase γ Autophosphorylierung. Zusammenfassend kann man sagen, dass Phospholipide, welche die PI-3-Kinase γ nahezu nicht binden keinen Einfluß auf die Enzym-Aktivitäten haben, wohingegen PI-3-Kinase γ -bindende saure Phospholipide zur Hemmung der Autophosphorylierung führen. Substrat- und saure Nicht-Substrat-Phospholipide bedingen eine annähernd gleiche Hemmung der Proteinkinase-Aktivität.

4.1.4.2. PI-3-Kinase γ -Aktivitäten nach Vorinkubation mit Phospholipiden

Vorversuche zeigten, dass die maximale Bindung von Phospholipiden an PI-3-Kinase γ nach 30 Minuten erreicht ist. Deshalb sollte geprüft werden, ob der Hemmeffekt der PI-3-Kinase γ bindenden Phospholipide auf die PI-3-Kinase γ -Aktivitäten bei maximaler Lipidbindung noch verstärkt wird.

Die Lipidkinase-Aktivität wurde nach einstündiger Vorinkubation der PI-3-Kinase γ mit den Phospholipiden PA, PS, PE und PC gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb.14 dargestellt.

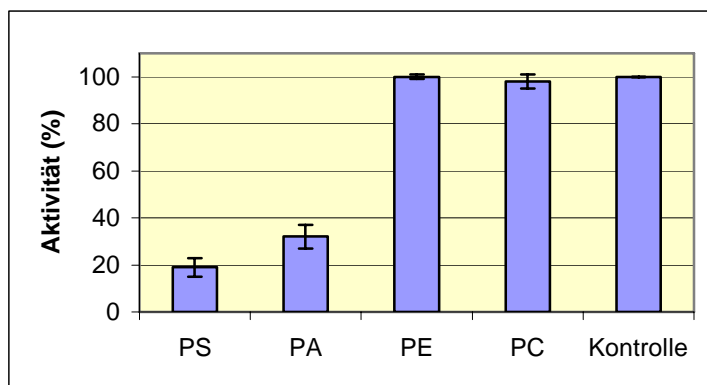


Abb. 14: Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ nach Vorinkubation mit Nicht-Substrat-Lipiden

Mischliposomen mit 35 Mol% Phospholipid in POPC oder reine POPC-Liposomen wurden mit affinitätsgereinigter PI-3-Kinase γ (GST/p110 γ) 60 Minuten vorinkubiert, anschließend wurde der Lipidkinase-Aktivitätstest entsprechend den Angaben unter Materialien und Methoden durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen. Die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ nach 60 Minuten Vorinkubation mit Lipidpuffer anstelle Phospholipid wurde 100% gesetzt (Kontrolle).

Die neutralen Phospholipide PC und PE haben auch nach Vorinkubation mit PI-3-Kinase γ keinen Effekt auf die Lipidkinase-Aktivität. PS und PA dagegen zeigen eine Aktivitätshemmung um ca. 80 bzw. 70% gegenüber dem Kontrollansatz. Diese Aktivitätshemmungen sind deutlich stärker, als die oben gezeigten Hemmungen in Anwesenheit von PA und PS im Aktivitätstest, ohne Phospholipid-Vorinkubation (Abb. 12). Während der Vorinkubation von PI-3-Kinase γ mit Phospholipid kommt es möglicherweise zu einer Konformationsänderung der PI-3-Kinase γ durch das gebundene Lipid, welche eine Aktivitätshemmung des Enzyms zur Folge hat. Neben der diskutierten Phospholipid-Bindung an der katalytischen Domäne könnte es zusätzlich zu einer N-terminalen Lipidbindung, z.B. an der C2-Domäne der PI-3-Kinase γ , während der Vorinkubation kommen. Sollte eine N-terminale Lipidbindung der PI-3-Kinase γ über Konformationsänderung des Enzyms zum Aktivitätsverlust führen, könnten auch Phosphoinositide einen Effekt zeigen. Um dies zu überprüfen wurde PI-3-Kinase γ mit den Substrat-Phospholipiden PI, PI-4-P und PI-4,5-P₂ inkubiert. Nach verschiedenen

Inkubationszeiten wurden analoge Volumina dieser Ansätze auf Lipidbindung, Lipidkinase- und Proteinkinase-Aktivität sowie PI-3-Kinase γ -Menge getestet. Die Ergebnisse nach PI-4,5-P₂-Vorinkubation sind in den Abbildungen 15 bis 17 gezeigt.

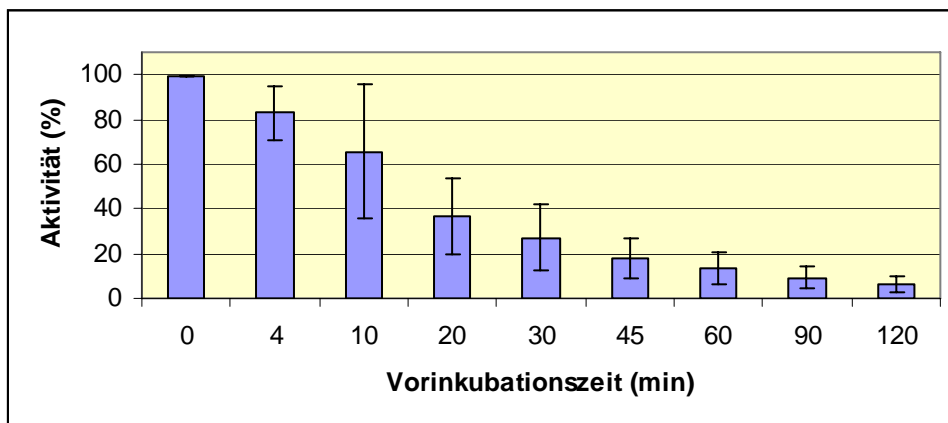


Abb. 15: Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ nach PI-4,5-P₂-Vorinkubation

Gereinigte PI-3-Kinase γ (GST/p110 γ) wurde mit Mischliposomen, welche 35 Mol% PI-4,5-P₂ in POPC enthielten, vorinkubiert. Nach den angegebenen Vorinkubationszeiten wurden analoge Volumina des Ansatzes entnommen und auf Lipidkinase-Aktivität getestet. Der Aktivitätstest wurde entsprechend den Angaben unter Materialien und Methoden durchgeführt. Die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ ohne PI-4,5-P₂-Vorinkubation wurde 100% gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen.

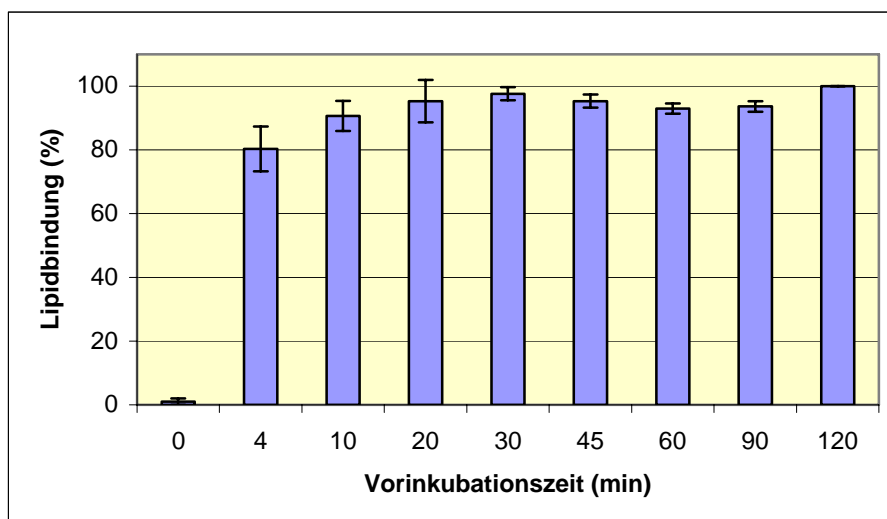


Abb. 16: Bindung der PI-3-Kinase γ an PI-4,5-P₂ nach unterschiedlichen Inkubationszeiten

Gereinigte PI-3-Kinase γ (GST/p110 γ) wurde mit Mischliposomen, welche 35 Mol% PI-4,5-P₂ in POPC enthielten, inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurde die Lipidbindung entsprechend den Angaben unter Materialien und Methoden gemessen. Das Fluoreszenzsignal der Bindung von PI-4,5-P₂ an PI-3-Kinase γ nach der längsten Inkubationszeit (120 min) wurde 100% gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen.

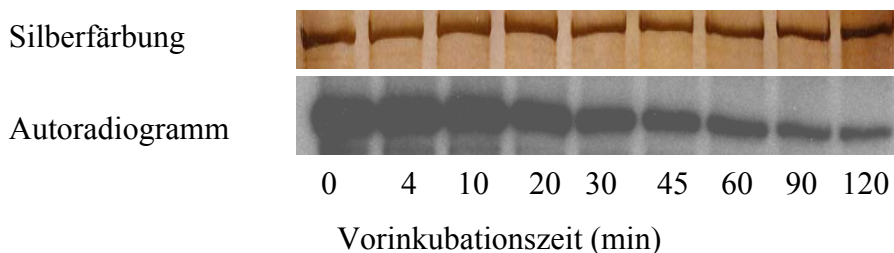


Abb. 17: Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ nach PI-4,5-P₂-Vorinkubation

Gereinigte PI-3-Kinase γ (GST/p110 γ) wurde mit Mischliposomen, welche 35 Mol% PI-4,5-P₂ in POPC enthielten, vorinkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurde die vorinkubierte PI-3-Kinase γ auf den Einbau von radioaktiv markierten ³²P-Phosphat, entsprechend den Angaben unter Materialien und Methoden, untersucht. Dargestellt sind ein Silber-gefärbtes Proteingel der affinitätsgereinigten PI-3-Kinase γ sowie ein repräsentatives Autoradiogramm.

Die Proteinfärbung zeigt, dass in allen Ansätzen vergleichbare Mengen an PI-3-Kinase γ vorhanden waren. Die PI-4,5-P₂-Bindung nimmt mit längerer Vorinkubationszeit zu und erreicht nach ca. 30 Minuten ihr Maximum. Gegenläufig dazu verhalten sich die Lipid- und Proteinkinase-Aktivitäten der PI-3-Kinase γ , welche beide über die Zeit kontinuierlich abnehmen. Analoge Ergebnisse erhält man auch nach Vorinkubation mit PI oder PI-4-P (Daten nicht gezeigt).

4.1.4.3. Zusammenhang zwischen Enzym-Aktivitäten und PI-4,5-P₂-Bindung bei PI-3-Kinase γ (Wildtyp) und Mutanten

Es ist denkbar, dass Phospholipide auch außerhalb der katalytischen Domäne an PI-3-Kinase γ binden können. Aus diesem Grund wurde der Zusammenhang zwischen den Enzymaktivitäten und der PI-4,5-P₂-Bindung an PI-3-Kinase γ (Wildtyp, aa 37-1102), sowie den Mutanten aa 37-773 (N-terminaler Teil der PI-3-Kinase γ), aa 773-1102

(C-terminaler Teil der PI-3-Kinase γ) und der Mutante K832R aa 37-1102 untersucht. Für die genannten Mutanten zeigten wir schon bei früheren Untersuchungen, dass sie, im Gegensatz zum Wildtyp, weder über Lipid-noch Proteinkinase-Aktivität verfügen (Stoyanova et al., 1997). Es sollte nun noch überprüft werden, ob diese Mutanten in der Lage sind PI-4,5-P₂ zu binden. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 gezeigt.

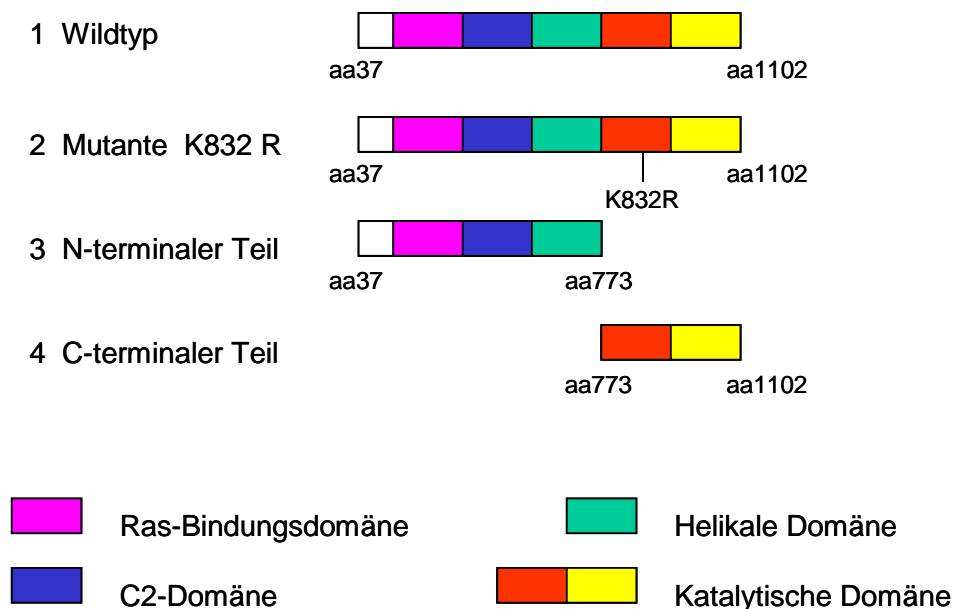


Abb. 18 A: Schematische Darstellung der verwendeten PI-3-Kinase γ und Mutanten

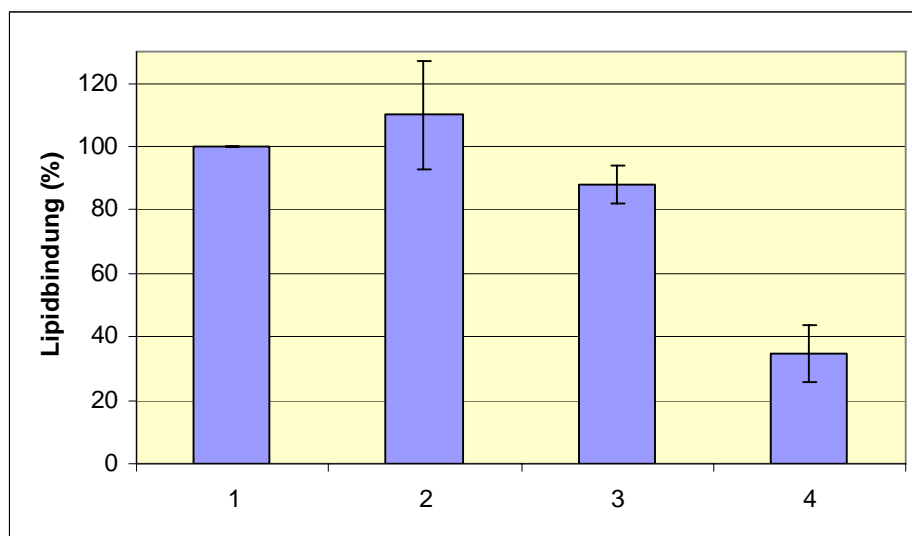


Abb. 18 B: PI-4,5-P₂-Bindung an PI-3-Kinase γ und Mutanten
(1= aa 37-1102; 2= K832 R; 3= aa 37-773; 4= aa 773-1102)

Gleiche Molmengen gereinigter GST-Fusionsproteine von Wildtyp und Mutanten wurden mit fluoreszenzmarkierten Mischliposomen, welche 35 Mol% PI-4,5-P₂ in

POPC enthielten, inkubiert. Der Bindungstest wurde wie unter Materialien und Methoden beschrieben durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen. Das Fluoreszenzsignal der Bindung von PI-4,5-P₂ an PI-3-Kinase γ (Wildtyp; aa 37-1102) wurde 100 % gesetzt.

Im Gegensatz zur nicht vorhandenen Lipid- und Protein-Kinaseaktivität zeigen alle Mutanten PI-4,5-P₂-Bindung. Die K832R-Mutante und das N-terminale Fragment (aa 37-773), welches die Ras-Bindungsdomäne, die C2-Domäne sowie die Helikale Domäne enthält, binden PI-4,5-P₂ annähernd so stark wie der Wildtyp. Das C-terminale Fragment (aa 773-1102), welches die katalytische Domäne enthält, bindet dagegen nur ca. 40% PI-4,5-P₂ im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Lipidbindung unabhängig von der Lipid- und Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ erfolgt. Neben der beschriebenen PI-4,5-P₂-Bindungsstelle innerhalb der katalytischen Domäne der PI-3-Kinase γ existiert noch mindestens eine weitere N-terminale Bindungsstelle.

4.1.5. Phospholipid-Bindung an Fragmente der PI-3-Kinase γ

Da die gezeigten Ergebnisse auf eine N- und C-terminale PI-4,5-P₂-Bindung der PI-3-Kinase γ hinweisen, sollte als Nächstes überprüft werden, ob auch andere Phospholipide N- und/oder C-terminal an PI-3-Kinase γ binden können. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 dargestellt.

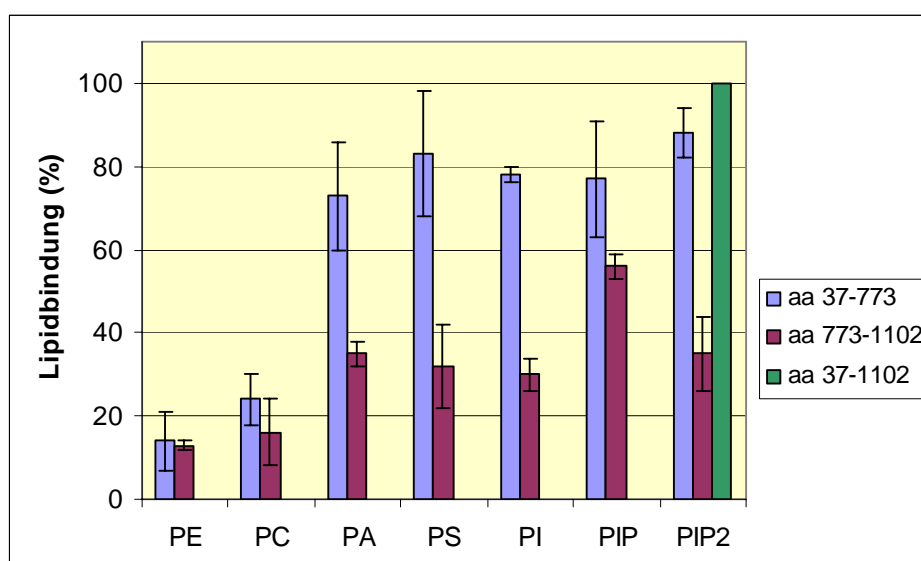


Abb.19: Bindung der Phospholipide an das N- und C-terminale Fragment der PI-3-Kinase γ

Gleiche Molmengen der affinitätsgereinigten N- und C-terminalen PI-3-Kinase γ -Fragmente (GST/aa 37-773 und GST/aa 773-1102) wurden mit fluoreszenzmarkierten Mischliposomen, welche 35 Mol% der Phospholipide in POPC oder 99 Mol% POPC enthielten, inkubiert. Der Bindungstest wurde wie unter Materialien und Methoden beschrieben durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen. Das Fluoreszenzsignal der PI-4,5-P₂-Bindung an Wildtyp PI-3-Kinase γ (GST/aa37-1102) wurde 100 % gesetzt.

Beide Fragmente zeigen, wie auch schon das Wildtyp-Protein, nahezu keine Bindung an die neutralen Phospholipide PC und PE. Im Gegensatz dazu werden alle negativ geladenen Phospholipide (PA, PS, PI, PI-4-P und PI-4,5-P₂) von beiden Fragmenten gebunden, wobei der N-terminale Teil (aa 37-773) der PI-3-Kinase γ prinzipiell eine deutlich stärkere Bindung als der C-terminale Teil (aa 773-1102) zeigt. Der C-terminale Teil der PI-3-Kinase γ , welcher die katalytische Domäne enthält, zeigt eine leichte Bevorzugung für die Bindung an PI-4-P gegenüber den anderen sauren Phospholipiden. Die beiden anderen PI-3-Kinase γ -Substrate PI und PI-4,5-P₂ werden aber analog den Phospholipiden PA und PS gebunden. Untersuchungen zur weiteren Charakterisierung der Lipidbindung (Einfluß hoher Salzkonzentration, pH-Wertänderungen und IP₃-Kompetition) ergaben keine prinzipiellen Unterschiede zwischen den beiden Fragmenten oder gegenüber dem Wildtyp. Ebenso analoge Ergebnisse zum Wildtyp-Enzym (Abb. 10) zeigten die Untersuchungen zur Stabilität der Fragment-Phospholipid-Komplexe (Ergebnisse nicht gezeigt). Demzufolge binden N- und C-terminaler Teil der PI-3-Kinase γ wahrscheinlich über einen analogen Mechanismus an Phospholipide.

4.2. Untersuchungen zur zellulären Lokalisation der PI-3-Kinase γ

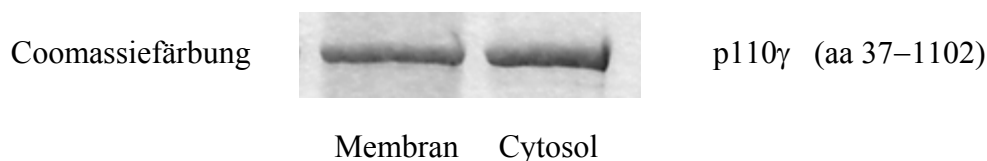
4.2.1. Verteilung der GST-Fusionsproteine der PI-3-Kinase γ in Sf 9-Zellen

Nach den in vitro-Untersuchungen zur Lipidbindung der PI-3-Kinase γ an kleine unilamellare Liposomen sollte nun eine mögliche in vivo-Relevanz überprüft werden. Die in vitro eingesetzten Proteine waren als GST-Fusionsproteine aus Sf 9-Zellen gewonnen worden. Deshalb sollte als Erstes die zelluläre Verteilung aller verwendeten GST-Fusionsproteine innerhalb der Sf 9-Zellen untersucht werden. Sf 9-Zellen wurden dazu mit den entsprechenden Baculoviren infiziert und 72 Stunden später durch nicht

denaturierende hypotone Lyse lysiert. Membran- und Cytosol-Fractionen wurden über Zentrifugation gewonnen. Die Proteine der Membranfraktion wurden mit dem nicht denaturierenden Detergenz Triton X-100 (Tritonlyse) in Lösung gebracht. Die GST-Fusionsproteine konnten nun von den anderen Cytosol- und Membran-Proteinen durch Bindung an Glutathionsepharose isoliert werden. Die Coomassiefärbung nach SDS-PAGE zeigte die Verteilung der GST-Fusionsproteine in Cytosol- und Membranfraktionen (detaillierte Beschreibung unter Materialien und Methoden).

4.2.1.1. Protein- und Aktivitätsverteilung der GST-PI-3-Kinase γ

Die in vitro-Lipidbindungsversuche zeigten eine Bindung der GST-PI-3-Kinase γ an die sauren Membran-Phospholipide PA, PS, PI, PI-4-P und PI-4,5-P₂. Diese Ergebnisse machen eine Bindung der PI-3-Kinase γ an die Plasmamembran der Zelle über Phospholipidbindung wahrscheinlich. Deshalb wurde die Anwesenheit der GST-PI-3-Kinase γ in Cytosol- und Membranfraktionen von Sf 9-Zellen überprüft. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 gezeigt. Da die Zell-Lyse unter nicht denaturierenden Bedingungen erfolgte, konnte auch die Lipidkinaseaktivität der affinitätsgereinigten GST-PI-3-Kinase γ in Cytosol- und Membranfraktionen bestimmt werden. Diese Ergebnisse sind ebenfalls in Abb. 20 gezeigt.



Lipidkinaseaktivität

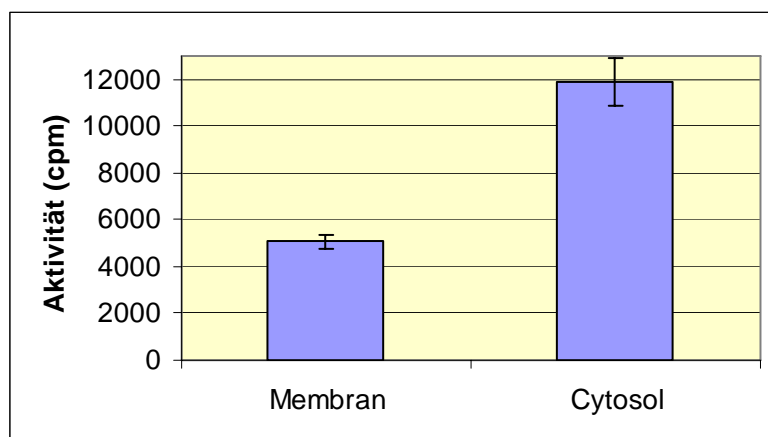


Abb. 20: Protein- und Aktivitätsverteilung der GST-PI-3-Kinase γ zwischen Cytosol- und Membran-Fractionen in Sf 9-Zellen.

Gereinigte GST-PI-3-Kinase γ der Membran- und Cytosolfractionen wurde auf Lipidkinase-Aktivität getestet und parallel dazu nach SDS-PAGE in der Coomassiefärbung dargestellt. Die Bestimmung der Lipidkinase-Aktivität erfolgte entsprechend den Angaben unter Materialien und Methoden. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Coomassiefärbung zeigt eine annähernde Gleichverteilung der GST-PI-3-Kinase γ zwischen Cytosol- und Membranfraktionen, wobei der etwas größere Anteil sich im Cytosol befindet. Diese Ergebnisse werden durch den Lipidkinase-Aktivitätstest bestätigt mit ca. 1/3 PI-3-Kinase γ -Aktivität in der Membranfraktion und ca. 2/3 im Cytosol. Proteinfärbung und Aktivitätstest zeigen, dass GST-PI-3-Kinase γ an die Membranen von Sf 9-Zellen binden kann und Enzymaktivität besitzt.

Analoge Resultate erhält man, wenn GST-PI-3-Kinase γ über Immunopräzipitation mit Anti-PI-3-Kinase γ - oder Anti-GST-Antikörpern aus Membran- und Cytosol-Fractionen der Sf 9-Zellen isoliert wird (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.2.1.2. Zelluläre Verteilung der PI-3-Kinase γ -Mutanten

Nachdem das Wildtyp-Enzym in der Membranfraktion detektiert werden konnte, sollte nun überprüft werden, wie die K832R-Mutante sowie der N (aa 37-773)- und C (aa 773-1102)-terminale Teil der PI-3-Kinase γ in Sf 9-Zellen zwischen Membran und Cytosol verteilt sind. Da alle drei Mutanten keine Enzymaktivitäten besitzen erübrigte sich der Lipidkinase-Aktivitätstest.

Coomassiefärbung

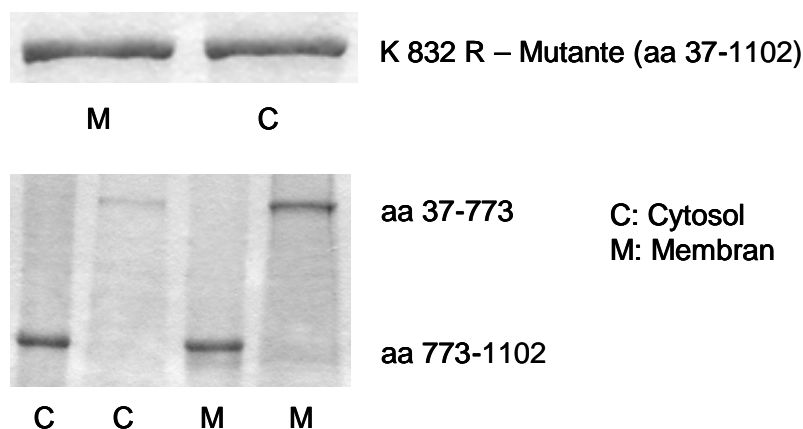


Abb. 21: Verteilung der GST-PI-3-Kinase γ -Mutanten zwischen Cytosol (C)- und Membran (M)-Fraktionen in Sf 9-Zellen.

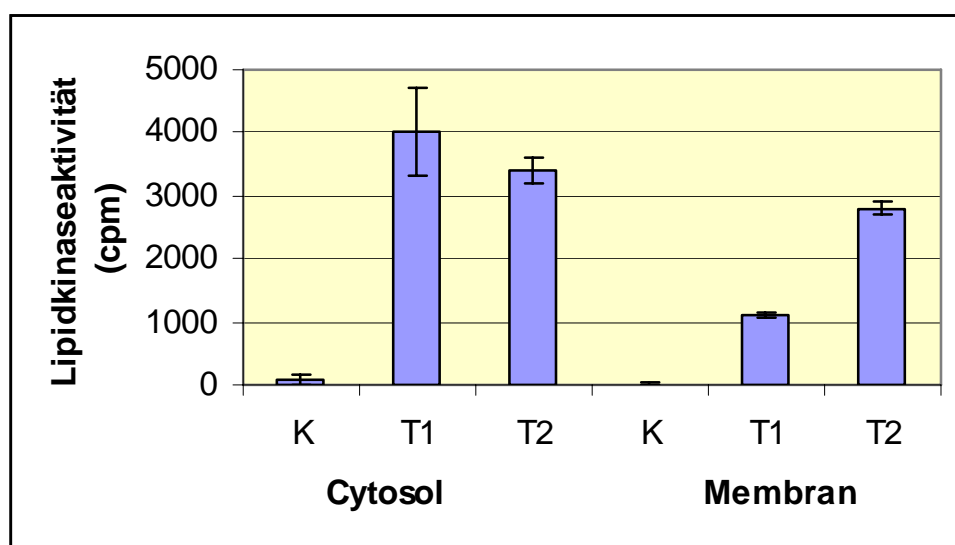
Die gereinigten GST-Fusionsproteine (K832R- Mutante, aa 37-773 und aa 773-1102 der PI-3-Kinase γ) aus Cytosol- und Membranfraktionen von Sf 9-Zellen wurden nach SDS-PAGE in der Coomassiefärbung dargestellt.

Die K832R-Mutante und das C-terminale Fragment (aa 773-1102) der PI-3-Kinase γ zeigen ähnlich dem Wildtypprotein eine annähernde Gleichverteilung zwischen Cytosol- und Membranfraktionen. Dagegen ist das in vitro stark lipidbindende N-terminale Fragment (aa 37-773) der PI-3-Kinase γ vorrangig in der Membranfraktion lokalisiert. Analoge Ergebnisse zeigt die Immunodetektion mit Anti-GST- Antikörpern nach SDS-PAGE und Westernblot dieser Proteine aus Membran-und Cytosol-Fractionen (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.2.2. Lokalisation der nativen, überexprimierten PI-3-Kinase γ in 293-Zellen

Da für GST-PI-3-Kinase γ in Sf 9-Zellen eine Membranlokalisierung gezeigt werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob auch native, überexprimierte PI-3-Kinase γ an die Plasmamembran der Zelle binden kann. Zwei mit PI-3-Kinase γ transfizierte 293-Zelllinien (T1 und T2) wurden analog den Sf 9-Zellen lysiert und fraktioniert. Zur Kontrolle (K) wurden nicht transfizierte 293-Zellen mitgeführt. PI-3-Kinase γ wurde von den anderen Proteinen der Membran-und Cytosol-Fractionen über Immunopräzipitation (IP) mit einem polyklonalen Anti-PI-3-Kinase γ -Antikörper getrennt.

Lipidkinase-Aktivität



Immunodetektion

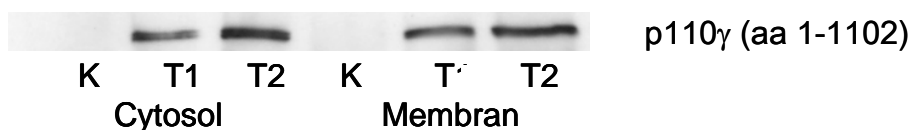


Abb. 22: Aktivitäts- und Proteinverteilung der PI-3-Kinase γ zwischen Cytosol- und Membranfraktionen in 293-Zellen

Immunopräzipitierte PI-3-Kinase γ der Membran- und Cytosolfractionen von 293-Zellen wurde auf Lipidkinase-Aktivität getestet. Außerdem wurde die PI-3-Kinase γ dieser Immunpräzipitate nach SDS-PAGE und Westernblot in der Immunodetektion mit einem monoklonalen Anti-PI-3-Kinase γ -Antikörper dargestellt. Im Lipidkinase-Aktivitätstest sind die Mittelwerte (\pm S. D.) aus drei unabhängigen Versuchen gezeigt.

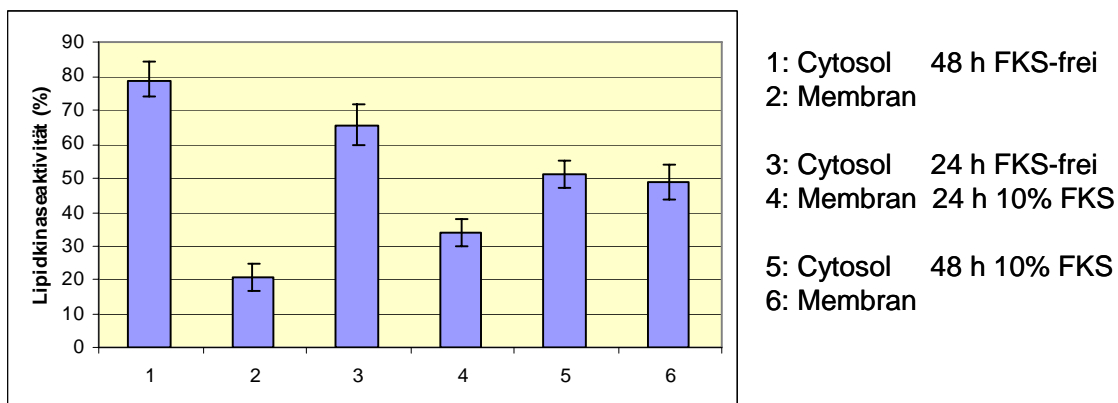
Native überexprimierte PI-3-Kinase γ (aa 1-1102) in 293-Zellen zeigt eine analoge Verteilung und Lipidkinase-Aktivität zwischen Cytosol- und Membranfraktion wie die GST-PI-3-Kinase γ (aa 37-1102) in Sf 9-Zellen. Dies ist ein wichtiger Hinweis, dass GST nicht das Bindungsverhalten der PI-3-Kinase γ beeinflusst.

4.2.3. Zelluläre Verteilung der konstitutiven PI-3-Kinase γ in U937-Zellen

4.2.3.1. Translokation der PI-3-Kinase γ in Abhängigkeit von der Anwesenheit von FKS

Für überexprimierte und GST-gebundene PI-3-Kinase γ konnte eine Membranbindung gezeigt werden. Nun sollte überprüft werden, ob auch konstitutiv vorkommende PI-3-Kinase γ an die Membran binden kann und ob diese Bindung von der FKS-Anwesenheit im Kulturmedium abhängig ist.

Lipidkinase-Aktivität



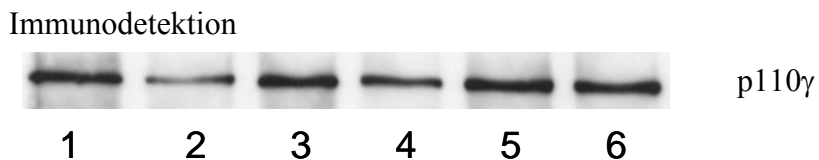


Abb. 23: Zelluläre Verteilung der PI-3-Kinase γ in U937-Zellen in Abhängigkeit von FKS

U937-Zellen wurden unter Standardkulturbedingungen (48 h mit 10 % FKS) kultiviert. Parallel dazu wurden U937-Zellen 48 h FKS-frei inkubiert. Ein dritter Ansatz wurde erst 24 h FKS-frei und anschließend für 24 h mit 10 % FKS weiterinkubiert. PI-3-Kinase γ wurde aus Cytosol-und Membranfraktionen dieser U937-Zellen analog dem Vorgehen in 293-Zellen isoliert. Die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ in den Immunopräzipitaten der verschiedenen Cytosol-und Membranfraktionen wurde getestet. Die Summe der jeweiligen Aktivitäten aus Cytosol-und Membranfraktionen wurde 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte der prozentuale Verteilung zwischen Cytosol-und Membranfraktionen aus drei unabhängigen Versuchen (\pm S. D.). Außerdem wurde die PI-3-Kinase γ dieser Immunopräzipitate nach SDS-PAGE und Westernblot in der Immunodetektion mit einem monoklonalen Anti-PI-3-Kinase γ -Antikörper dargestellt.

Bei Kultivierung unter Normalbedingungen (10 % FKS im Medium) zeigt PI-3-Kinase γ nicht nur in der Immunodetektion, sondern auch in der Lipidkinase-Aktivität eine Gleichverteilung zwischen Membran-und Cytosol-Fraktion. Dies zeigt, dass nicht nur überexprimierte, sondern auch konstitutive PI-3-Kinase γ in der Lage ist an die Membran zu binden. Nach 48 h FKS-freier Inkubation nimmt sowohl die PI-3-Kinase γ -Menge, als auch die Aktivität des Enzyms in der Membranfraktion deutlich ab. Trotzdem bleibt ein bestimmter Anteil der Gesamt-PI-3-Kinase γ in der Membran lokalisiert (ca. 20 %). Dieser Vorgang ist offenbar reversibel, denn wenn nach FKS-freier Inkubation wieder FKS dem Medium zugesetzt wird, steigt sowohl die PI-3-Kinase γ -Menge als auch die Lipidkinase-Aktivität in der Membranfraktion an.

4.2.3.2. Lokalisation der PI-3-Kinase γ nach Wortmannin-Behandlung der Zellen

Die in vitro-Lipidbindung der katalytisch inaktiven K832R-Mutante der PI-3-Kinase γ zeigte keine Unterschiede zum aktiven Wildtyp-Enzym. Auch die Verteilung dieser GST-gebundenen Mutante in Sf 9-Zellen ergab keine Unterschiede zur GST-Wildtyp-

PI-3-Kinase γ . Beide Proteine zeigen eine annähernde Gleichverteilung zwischen Cytosol- und Membran-Fractionen. Es sollte nun parallel dazu die Lokalisation kinase-inaktivierter PI-3-Kinase γ in U937-Zellen ermittelt werden. Zur Inaktivierung der PI-3-Kinase γ wurde der PI-3-Kinase-Inhibitor Wortmannin eingesetzt, welcher kovalent an Lys⁸³² der PI-3-Kinase γ binden kann. Wortmannin-gebundene PI-3-Kinase γ ist nicht mehr fähig ATP zu binden und zeigt demzufolge weder Lipidkinase- noch Proteinkinase-Aktivität (Stojanova et al., 1997). Zur Inaktivierung der PI-3-Kinase γ wurden U937-Zellen für 30 Minuten mit 50-2000 nM Wortmannin behandelt. Als Kontrollansatz wurden Zellen anstelle von Wortmannin mit DMSO, dem Wortmannin-Lösungsmittel inkubiert. Anschließend wurde jeweils die Hälfte der Zellen einer Tritonlyse zur Gewinnung des Gesamt-Zell-Lysates und die andere Hälfte einer hypotonen Lyse zur Membran- und Cytosol-Fraktionierung unterworfen. PI-3-Kinase γ wurde aus dem Gesamtlysate sowie den Membran- und Cytosol-Fractionen über Immunopräzipitation mit einem polyklonalen Anti-PI-3-Kinase γ -Antikörper isoliert.

Die PI-3-Kinase γ aus dem Gesamt-Zell-Lysate diente der Lipidkinase-Aktivitätsbestimmung, um den Hemmeffekt von Wortmannin zu überprüfen. Die Ergebnisse sind in Abb. 24 gezeigt. Cytosol- und Membranfraktionen wurden auf PI-3-Kinase γ -Anwesenheit untersucht. Diese Ergebnisse sind in Abb. 25 dargestellt.

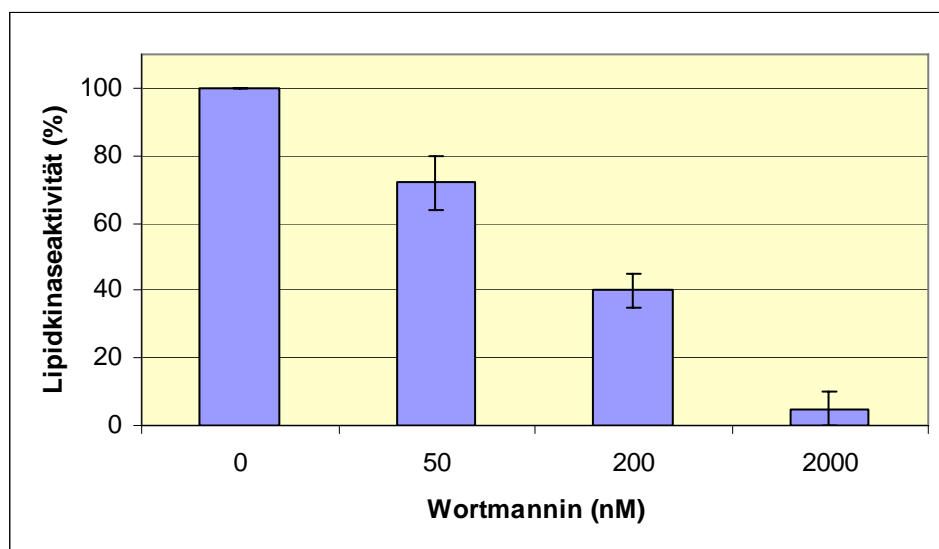


Abb. 24: PI-3-Kinase γ -Aktivität nach Inkubation der Zellen mit verschiedenen Wortmannin-Konzentrationen

Die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ aus U937-Zellen wurde nach Inkubation dieser Zellen mit 0 (Kontrolle), 50, 200 und 2000 nM Wortmannin und nach Isolation der Gesamtzell-PI-3-Kinase γ bestimmt. Die detaillierte Versuchsdurchführung ist unter Materialien und Methoden beschrieben. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) einer Dreifach-Bestimmung. Die Lipidkinase-Aktivität im Kontrollansatz (DMSO) wurde 100 % gesetzt.

Wortmanninbehandlung der U937-Zellen führt wie erwartet zu einer konzentrations-abhängigen Hemmung der Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ . Behandlung der Zellen mit 50 nM Wortmannin zeigt eine ca. 30 %ige Hemmung der Aktivität. Bei 200 nM Wortmannin ist die PI-3-Kinase γ schon um 60 % gegenüber dem Kontrollansatz gehemmt und 2000 nM verursachen eine nahezu komplette Hemmung der Aktivität.

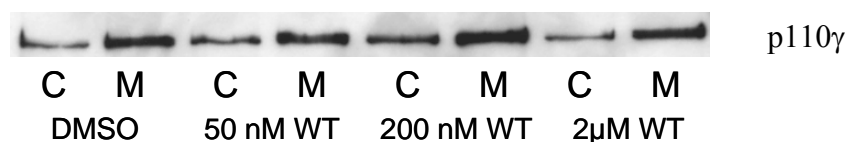


Abb. 25: Lokalisation der PI-3-Kinase γ in U937-Zellen nach Behandlung der Zellen mit Wortmannin.

Dargestellt ist die Verteilung der PI-3-Kinase γ zwischen Cytosol (C) -und Membran (M)-Fraktionen aus U937-Zellen nach Behandlung der Zellen mit 0 (Kontrolle, DMSO), 50, 200 und 2000 nM Wortmannin (WT). Die durch Immunopräzipitation aus Membran- und Cytosolfractionen isolierte PI-3-Kinase γ wurde nach SDS-PAGE und Westernblot mit einem monoklonalen Anti-PI-3Kinase γ -Antikörper detektiert.

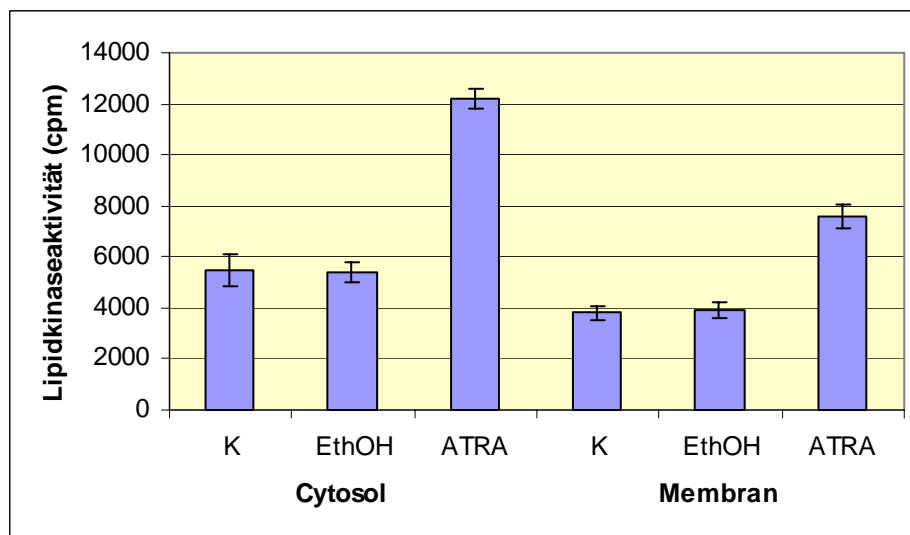
Im Gegensatz zur Lipidkinase-Aktivität zeigt die PI-3-Kinase γ keine Änderung ihrer zellulären Lokalisation in Abhängigkeit von den Wortmanninkonzentrationen. Auch bei totaler Aktivitätshemmung (2000 nM Wortmannin) ist die Verteilung des Enzyms analog dem Kontrollansatz.

4.2.3.3. Verteilung der Retinsäure-induzierten PI-3-Kinase γ

Die Behandlung von U937-Zellen mit All-Trans-Retinsäure (ATRA) resultiert in einer erhöhten Genexpression der PI-3-Kinase γ . Die verstärkte Expression der PI-3-Kinase γ korreliert mit einer Erhöhung der PI-3-Kinase γ Lipidkinase-Aktivität (Baier et al.,

1999). Es sollte nun überprüft werden, wie sich diese verstärkt exprimierte PI-3-Kinase γ in den U937-Zellen zwischen Cytosol- und Membran-Fraktionen verteilt.

Lipidkinase-Aktivität



Immunodetektion

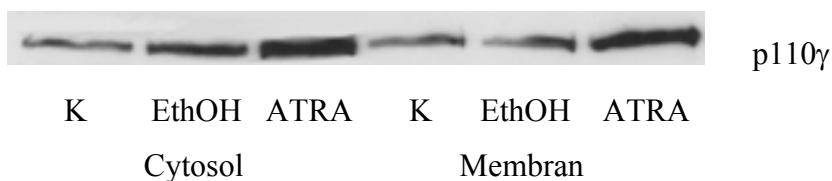


Abb. 26: Verteilung der Retinsäure-induzierten PI-3-Kinase γ in U937-Zellen

U937-Zellen wurden 48 h mit 1 μ M ATRA bzw. mit Ethanol (EthOH), dem Lösungsmittel für Retinsäure, behandelt. Als Kontrolle (K) wurden Zellen ohne Zusatz, unter Standardbedingungen, weiterkultiviert. Die PI-3-Kinase γ wurde aus Cytosol- und Membran-Fraktionen dieser U937-Zellen über Immunopräzipitation isoliert und auf Lipidkinase-Aktivität getestet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (\pm S. D.). Parallel dazu wurde PI-3-Kinase γ dieser Immunopräzipitate nach SDS-PAGE und Westernblot in der Immunodetektion mit einem monoklonalen Anti-PI-3-Kinase γ -Antikörper dargestellt. Die detaillierte Versuchsdurchführung ist unter Materialien und Methoden beschrieben.

Ethanol-behandelte U937-Zellen zeigen die gleiche PI-3-Kinase γ -Menge, Aktivität und Verteilung wie die unbehandelten Kontrollzellen. ATRA-Behandlung führt zu einer deutlichen Zunahme der PI-3-Kinase γ -Menge in Cytosol- und Membran-Fraktionen. Analog dazu kommt es zu einer Verdopplung der PI-3-Kinase γ -Aktivitäten in den Cytosol- und Membran-Fraktionen. Die durch ATRA vermehrt exprimierte PI-3-Kinase γ verteilt sich analog der normal exprimierten PI-3-Kinase γ und zeigt keine Bevorzugung für Cytosol- oder Membran-Fraktionen.

4.2.3.4. PI-3-Kinase γ -Lokalisation nach Einbau von Phospholipiden in die Zellmembran

Die *in vitro* Lipidbindungsversuche zeigen nahezu keine Bindung der PI-3-Kinase γ an die neutralen, ungeladenen Phospholipide PE und PC. Im Gegensatz dazu werden die negativ geladenen Phospholipide PA, PS neben den Substrat-Phospholipiden sehr gut gebunden. Es stellte sich nun die Frage, ob ein zusätzlicher Einbau von sauren Phospholipiden in die Plasmamembran von U937-Zellen zu einer verstärkten Membranlokalisation der PI-3-Kinase γ führen kann. Um dies zu überprüfen, wurden U937-Zellen mit fluoreszenzmarkierten kleinen, unilamellaren Phospholipid-Vesikeln inkubiert. Zuerst wurde der Einbau dieser Phospholipid-Vesikel in U937-Zellen in Abhängigkeit von der Vesikelmenge getestet.

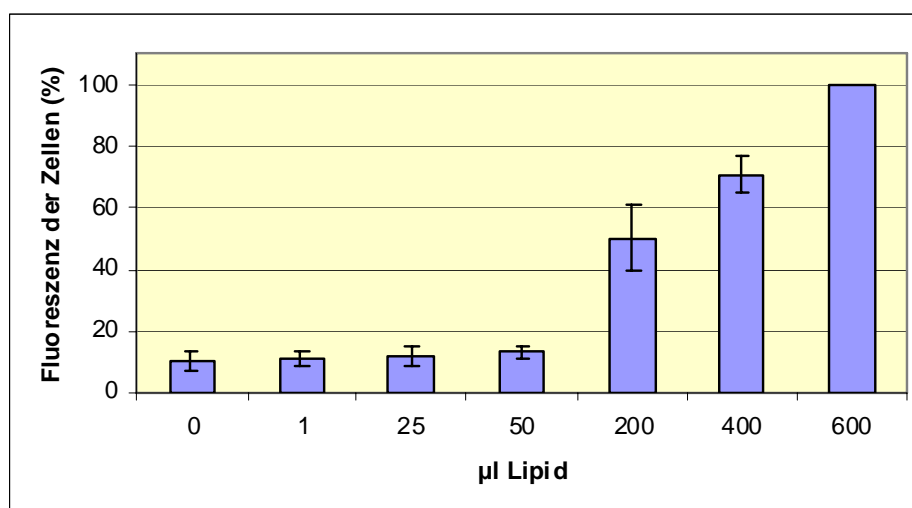


Abb. 27: Phospholipid-Einbau in U937-Zellen

U937-Zellen wurden mit verschiedenen Volumina fluoreszenzmarkierter Mischliposomen, welche 99 Mol% Phosphoinositid-Mix (PS/PI) enthielten, 48 Stunden unter

Standardkultur-Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz der gewaschenen Zellen gemessen. Der Fluoreszenzwert der Zellen mit dem größten Vesikel-Volumen wurde 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S. D.) aus drei unabhängigen Versuchen. Die detaillierte Versuchsdurchführung ist unter Materialien und Methoden beschrieben.

Erst ab 200 μ l Vesikelzusatz ist ein deutlicher Lipideinbau in U937-Zellen zu messen. Dieser Fluoreszenzwert lässt sich bei 600 μ l Lipidzusatz in etwa verdoppeln.

Parallel zur Testung des Phospholipideinbaus wurde die Zellproliferation überprüft.

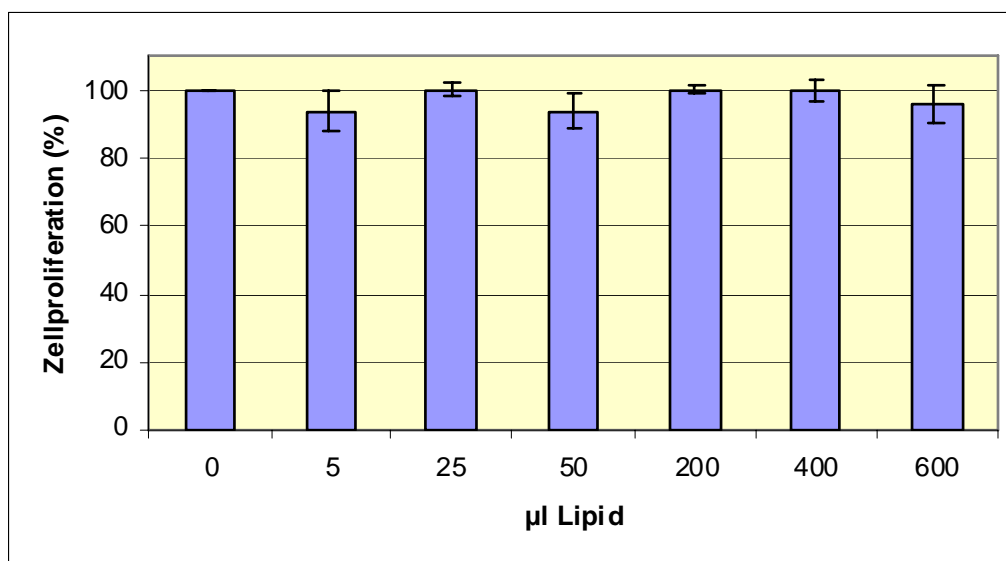


Abb.28: Proliferation von U937-Zellen in Abhängigkeit vom Phospholipidzusatz

Nach 48 Stunden Inkubation der Zellen ohne und mit verschiedenen Volumina an Phospholipid-Vesikeln wurde in allen Ansätzen die Zellproliferation durch Zellzählung in der Neubauerkammer bestimmt. Die Zellzahl des Ansatzes ohne Lipidzusatz (Kontrollansatz) wurde 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Versuchen.

Inkubation der U937-Zellen mit unterschiedlichen Volumina an Phospholipidvesikeln (0 bis 600 μ l) über 48 Stunden zeigt keine Beeinflussung der Zellproliferation. Nachdem gezeigt werden konnte, dass Lipide in U937-Zellen ohne Beeinträchtigung der Zellproliferation eingebaut werden können, sollte deren möglicher Einbau in die Membran überprüft werden. Dazu wurden U937-Zellen mit dem größten getesteten Volumen an Lipidvesikeln (600 μ l) 48 Stunden inkubiert und anschließend fraktioniert. Über Zentrifugation wurde neben Cytosol- und Membranfraktionen auch die Kern- und

Partikelfraktion gewonnen. Der Lipideinbau wurde sowohl in den Fraktionen, als auch den gewaschenen Zellen mittels Fluoreszenzmessung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 29 gezeigt.

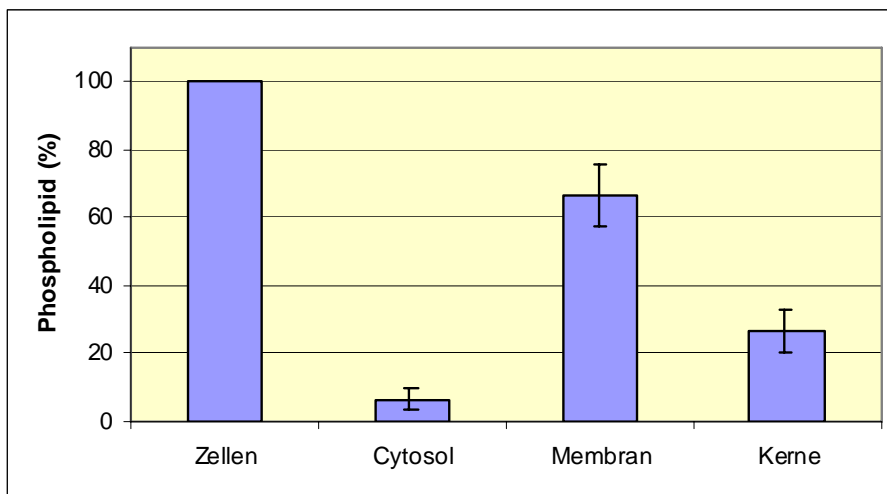


Abb. 29: Zelluläre Verteilung der eingebauten Phospholipide in U937-Zellen.

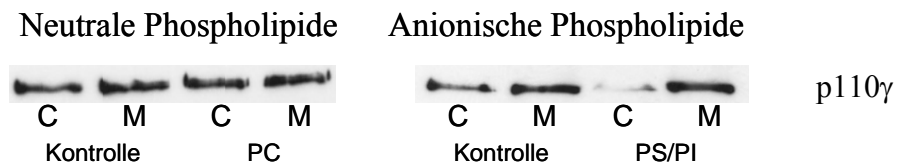
Der Fluoreszenzwert der gewaschenen Zellen wurde 100 % gesetzt. Aus den Fluoreszenzwerten der Fraktionen wurde die prozentuale Lipidverteilung berechnet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (\pm S.D.).

Die Ergebnisse zeigen, dass wie erwartet die Hauptmenge des Lipids in Membranen eingebaut wird.

Analoge Ergebnisse in Bezug auf Lipid-Einbau und- Verteilung sowie Zellproliferation (Daten nicht gezeigt) erhielten wir, wenn U937-Zellen mit neutralen Phospholipid-Vesikeln, mit 99 Mol% PC anstelle von Phosphoinositid-Mix, inkubiert wurden. Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl saure, als auch neutrale Phospholipide in die Plasmamembran von U937-Zellen eingebaut werden können, sollte getestet werden, ob dieser zusätzliche Lipideinbau zur verstärkten Membranbindung der PI-3-Kinase γ führt.

Dazu wurden U937-Zellen parallel mit sauren und neutralen Phospholipid-Vesikeln, analog den Vorversuchen, inkubiert. Zur Kontrolle wurden jeweils Zellen ohne Lipidzusatz mitgeführt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen unter hypotonen Bedingungen lysiert und fraktioniert. Die PI-3-Kinase γ der Membran- und Cytosol-Fractionen wurde über Immunopräzipitation isoliert und auf Protein- und Aktivitätsverteilung überprüft. Die Ergebnisse sind in Abb. 30 gezeigt.

Immunodetektion



Lipidkinase-Aktivität

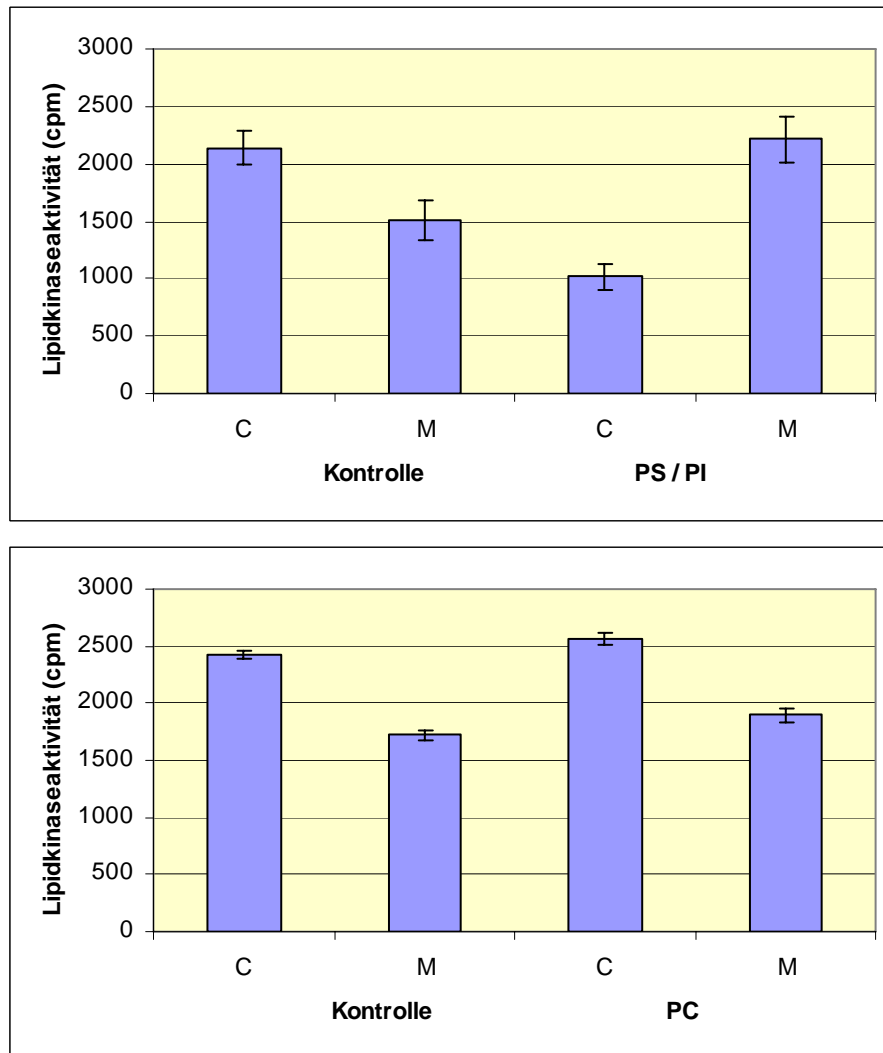


Abb. 30: Zelluläre Verteilung der PI-3-Kinase γ nach Phospholipideinbau in Zellmembranen von U937-Zellen.

PI-3-Kinase γ der Cytosol (C)-und Membran (M) –Fraktionen wurde nach SDS-PAGE und Westernblot mit einem monoklonalen Anti-PI-3-Kinase γ -Antikörper immunodetektiert. Außerdem wurde die isolierte PI-3-Kinase γ dieser Fraktionen auf

Lipidkinase-Aktivität getestet. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm S.D.) einer Dreifachbestimmung. Die detaillierte Versuchsdurchführung ist unter Materialien und Methoden beschrieben.

Der zusätzliche Einbau neutraler Phospholipide (PC) in die Plasmamembran von U937-Zellen zeigt weder eine Änderung der zellulären Lokalisation der PI-3-Kinase γ , noch werden die Lipidkinase-Aktivitäten der Fraktionen beeinflusst. Immunodetektion und Lipidkinase-Aktivitäten sind analog dem Kontrollansatz. Im Gegensatz dazu führt der zusätzliche Einbau anionischer Phospholipide (PS/PI) in die Membranen von U937-Zellen zur Translokation der PI-3-Kinase γ vom Cytosol in die Membranfraktion. Analog verhält sich auch die Lipidkinase-Aktivität, welche nach Lipideinbau im Cytosol deutlich abnimmt und in der Membranfraktion zunimmt.

5. Diskussion

5.1. Funktion und Lokalisation der PI-3-Kinase γ

PI-3-Kinasen gehören zu einer großen Familie intrazellulärer Regulatorproteine. Die in Säugerzellen exprimierten Klasse I PI-3-Kinasen sind für zahlreiche Zellreaktionen, wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Adhäsion, Endozytose, Kontraktion und Motilität verantwortlich. Heute weiß man, dass neben der Lipidkinase-Aktivität auch Proteinkinase-Aktivität und Protein-Protein-Interaktionen zur Signalvermittlung beitragen (Wetzker, 2004). Die Klasse I B PI-3-Kinase γ zeigt eine G $\beta\gamma$ -stimulierbare Autophosphorylierung am Serinrest 1101, allerdings nur in Anwesenheit von Lipid-vesikeln (Czapalla et al., 2003). Im Gegensatz zur Klasse I A PI-3-Kinasen ist die Autophosphorylierung der PI-3-Kinase γ ohne Einfluß auf die Lipidkinase-Aktivität (Carpenter et al., 1993; Dhand et al., 1994; Vanhaesebroeck et al., 1999; Czapalla et al., 2003). In vitro kann PI-3-Kinase γ auch das Adapterprotein p101, die Proteinkinase MEK-1 und das kleine G-Protein H-Ras phosphorylieren (Bondev et al., 1999; Foukas und Shepherd, 2004). Erste Hinweise für eine spezifische zelluläre Funktion der PI-3-Kinase γ Proteinkinase-Aktivität konnten Bondeva und Mitarbeiter zeigen. Eine PI-3-Kinase γ Mutante, die keine Lipid-, aber noch Protein-Kinase-Aktivität zeigt, ist für die MAPK-Aktivierung ausreichend. Im Gegensatz dazu kann eine katalytisch inaktive PI-3-Kinase γ diese Funktion nicht ausüben. Membran-gebundene PI-3-Kinase γ (PI-3-Kinase γ -CAAX) ist ebenfalls nicht in der Lage MAPK zu aktivieren. Offenbar ist nur die lösliche und Proteinkinase-aktive, aber nicht eine membrangebundene Form der PI-3-Kinase γ fähig MAPK zu aktivieren. Allerdings kann die membrangebundene PI-3-Kinase γ konstitutiv PI-3,4,5-P₃ bilden und die PKB aktivieren. Die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ erfordert die Bindung des Enzyms an Phosphoinositid-haltige Membranen, wohingegen die Proteinkinase-Aktivität, zumindest für die MAPK-Aktivierung, eine cytosolische Lokalisation verlangt (Bondeva et al., 1998). In Herzmyocyten geht PI-3-Kinase γ eine aktivitätsunabhängige Wechselwirkung mit der cAMP-abhängigen PDE3B ein (Patrucco et al., 2004). Diese Interaktion zwischen PI-3-Kinase γ und PDE3B führt über Aktivierung der Phosphodiesterase zu verringerter Herzkontraktionsfähigkeit. Zur Lokalisation der PI-3-Kinase γ bei dieser Protein-Protein-Interaktion gibt es keine Angaben. PI-3-Kinase γ besitzt zwei potentielle Kern-Import-Signale (R¹⁷RRRR und K⁸⁰⁶KKP) und kann demzufolge auch im Kern

lokalisiert sein. In HEPG2-Zellen transfizierter PI-3-Kinase γ transloziert nach Serum-Stimulation oder G $\beta\gamma$ -Überexpression, p101-unabhängig, zum Kern (Metjian et al., 1999). Es gibt Hinweise, dass Kern Gi/Go-Proteine in die PI-3-Kinase-Aktivierung involviert sind. Die Existenz eines autonomen Kern-Polyphosphoinositid-Metabolismus hängt zusammen mit der zellulären Proliferation und Differenzierung (Bacqueville et al., 2001). PI-3-Kinase γ ist anscheinend funktionsabhängig in Cytosol, Kern oder Membranen lokalisiert. In der ruhenden Zelle ist der Hauptanteil der PI-3-Kinase γ cytosolisch, aber nach Rezeptorstimulation kann sich innerhalb von Sekunden, parallel zur PI-3,4,5-P₃-Bildung, PI-3-Kinase γ an der Membran anreichern (Naccache et al., 2000). Trotzdem ist auch in unstimulierten Zellen immer ein Teil der PI-3-Kinase γ membranassoziiert (Stephens et al., 1994; Kular et al., 1997). Membranassoziierte PI-3-Kinase γ lässt sich, p101-unabhängig, durch G $\beta\gamma$ stimulieren (Brock et al., 2003). Die genannten Literaturbefunde lassen erkennen, dass über die Lokalisation der PI-3-Kinase γ , ihre Verteilung zwischen Cytosol und Membran, aber auch über die Art der Bindung an Zellmembranen noch wenig bekannt ist. Um der Beantwortung dieser Frage näher zu kommen, sind in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Bindung der PI-3-Kinase γ , *in vitro* an Phospholipidvesikel und *in vivo* an Zellmembranen, durchgeführt worden.

5.2. In vitro-Untersuchungen zur Phospholipid-Bindung der PI-3-Kinase γ

Rekombinante PI-3-Kinase γ kann in Abwesenheit anderer Proteinkomponenten PI, PI-4-P und PI-4,5-P₂ *in vitro* phosphorylieren, was darauf hinweist, dass das Enzym Phospholipide direkt binden kann (Stoyanov et al., 1995). Die Aminosäuren 970 bis 982 der PI-3-Kinase γ entsprechen den putativen Phosphoinositid-Kopfgruppen-Interaktionsseiten der Klasse II und III PI-3-Kinasen (Bondeva et al., 1998). Die Aminosäuren 964 bis 988 werden als essentiell für die Substratspezifität der PI-3-Kinase γ beschrieben (Walker et al., 1999). Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals die Bindung der PI-3-Kinase γ an alle drei Lipidsubstrate in Abhängigkeit vom Mol-Anteil der Phosphoinositide (0-99 Mol%). Mit steigendem Mol-Anteil der Substrat-Phosphoinositide verstärkt sich die Bindung an PI-3-Kinase γ . Das ist nicht

verwunderlich, da schon Mosior und McLaughlin 1992 beschrieben, dass die Bindung saurer Lipide an basische Peptide in Abhängigkeit von der Molkonzentration der sauren Lipide erfolgt (Mosior, M., und McLaughlin, S., 1992). PI-4,5-P₂, das am stärksten negativ geladene und bevorzugte in vivo Substrat der PI-3-Kinase γ wird am stärksten gebunden. Auch die Affinität der Proteinkinase C für Phosphoinositide erhöht sich in der Reihenfolge PI<PIP<PIP₂ (Pap et al., 1993). Walker und Mitarbeiter entwickelten in ihrer Arbeit ein Modell für die Positionierung der Kopfgruppe des PI-4,5-P₂ und definierten die Aminosäuren der PI-3-Kinase γ , welche vermutlich mit den Phosphatgruppen der Substratphosphoinositide interagieren. Das 1-Phosphat ist nahe Lys⁸⁰⁷ und Lys⁸⁰⁸ gelegen, 5-Phosphat grenzt an Lys⁹⁷³ und 4-Phosphat befindet sich in der Nähe der basischen Reste Arg⁹⁴⁷ und Lys⁹⁷³ (Walker et al., 1999). Die Bedeutung von Lys⁹⁷³ für den PI-4,5-P₂ und PI-4-P-Umsatz konnten Pirola und Mitarbeiter zeigen (Pirola et al., 2001). Nach Austausch von Lys⁹⁷³ gegen Gln kommt es zur kompletten Aufhebung des PI-4,5-P₂-Umsatzes, sowie zu einer deutlichen Hemmung des PI-4-P-Umsatzes. Nur der PI-Umsatz bleibt unbeeinflusst. Die negativen geladenen Phosphatreste der Substrat-Phosphoinositide scheinen also über ionische Wechselwirkungen an basische Aminosäuren der PI-3-kinase γ zu binden. Ein ähnlicher Bindungsmechanismus ist für die PI-4,5-P₂-Bindung an den ADP-Ribosylierungsfaktor 1 beschrieben. Hier kann die PIP₂-Bindung spezifisch aufgehoben werden, indem basische Lysin- und Arginin-Reste gegen die apolare Aminosäure Leucin ausgetauscht werden (Randazzo, 1997). Die PI-4,5-P₂-Bindungen an Phospholipase C- δ 1 und das spezifische Substratprotein der PKC MARCKS erfolgen ebenfalls über elektrostatische Wechselwirkungen, wobei auch hier die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin für die Lipidbindung essentiell sind (Yagisawa et al., 1998; Wang et al., 2002). Phospholipase C- δ 3 bindet neben PI-4,5-P₂ auch Phosphatidsäure mit hoher Affinität, wohingegen die Bindung an Phosphatidylserin deutlich geringer ist (Pawelczyk und Matecki, 1999). Die cytosolische Komponente der NADPH-Oxidase p40^{phox} zeigt, neben einer spezifischen PI-3,4-P₂-Bindung, Affinität für Phosphatidsäure und Phosphatidylserin (Stahelin et al., 2003). Auch PI-3-Kinase γ bindet nicht nur Phosphoinositide, sondern ebenso die anionischen Phospholipide PA und PS, wohingegen die neutralen Phospholipide PC und PE nahezu nicht gebunden werden (Kirsch et al., 2001). Ein ähnliches Bindungsverhalten zeigt das Mikrotubulus-assoziierte Protein MAP1B. Dieses bindet an saure Phospholipide, aber nicht an neutrales PC (Yamauchi et al., 1997). Analog zur PI-

3-Kinase γ bindet PLC- $\delta 1$ keine PC-Vesikel, zeigt aber eine starke Bindung an Mischliposomen aus PC und PI-4,5-P₂ (Rebecchi et al., 1992). Die Plasmamembran-Assoziation verschiedener Proteine (z.B. MARCKS-Proteine und die Tyrosinkinase Src) erfordert die elektrostatische Interaktion zwischen basischen Aminosäureresten des Proteins mit sauren Lipiden in der Membran (Murray et al., 1999). An der basischen Effektdomäne der MARCKS-Proteine kommt es bei steigender Salzkonzentration (100-300 mM) im Lipidbindungspuffer zu einer Erniedrigung der Bindung an PI-4,5-P₂ und PS (Wang et al., 2002). Burden und Mitarbeiter finden für die Typ II β Phosphatidylinositol-Phosphatkinase, welche die sauren Lipide PS, PA und Phosphoinositide, aber nicht das zwitterionische PC bindet, eine komplette Aufhebung der Lipidbindung in Anwesenheit von 1 M NaCl (Burden et al., 1999). PI-3-Kinase γ zeigt ein analoges Verhalten wie die Typ II β Phosphatidylinositol-Phosphatkinase, wobei sich das neutrale PE analog dem ebenfalls neutralen PC verhält.

PI-4,5-P₂ ist nicht nur das Substrat der Klasse I PI-3-Kinasen, sondern auch der Phospholipasen C. PLC spaltet PI-4,5-P₂ in das hydrophobe Diacylglycerol und die hydrophile Kopfgruppe IP₃. Phospholipase C- $\delta 1$ bindet PI-4,5-P₂ und IP₃ mit hoher Affinität. Der Austausch einer einzelnen basischen Aminosäure (Arg¹⁰⁵ gegen His) resultiert in einer vierfachen Affinitätserniedrigung der IP₃-Bindung und einer Reduktion der PI-4,5-P₂ - Hydrolyseaktivität (Shimohama et al., 1998). Die Bindung von PI-4,5-P₂ an PLC- $\delta 1$ kann durch IP₃ gehemmt werden. Dies deutet darauf hin, dass die IP₃-Bindungsseite(n) und die PI-4,5-P₂-Bindungsseite(n) identisch sind (Cifuentes et al., 1994). Die IP₃-Vorinkubation der PI-3-Kinase γ hat jedoch nahezu keinen Einfluß auf die PI-4,5-P₂-Bindung. Auch Romoser und Mitarbeiter finden bei PLC- $\beta 2$ keine Blockierung der PI-4,5-P₂-Bindung durch IP₃ (Romoser et al., 1996). Diese Ergebnisse weisen auf eine deutlich höhere Affinität der PI-4,5-P₂-Bindung gegenüber der IP₃-Bindung hin. Dies könnte darin begründet sein, dass für die PI-4,5-P₂-Bindung neben der ionischen Wechselwirkung noch andere Faktoren, möglicherweise hydrophobe Wechselwirkungen mit den Fettsäureketten des Phospholipids, entscheidend sind.

Seit mehreren Jahren gibt es Hinweise, dass Polyphosphoinositide an Proteine binden, die Aminosäureabschnitte mit einer Häufung basischer Aminosäuren enthalten. Janmey und Mitarbeiter zeigen, dass die Phosphoinositid-Bindungsseiten von Aktin-Bindungsproteinen eine Häufung der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin aufweisen. Synthetische Peptide, basierend auf diesen Sequenzen, binden an PIP und PIP₂ und

konkurrieren mit Gelsolin um die Bindung an Polyphosphoinositide (Janmey et al., 1992). Die Phosphatase PTEN benötigt für eine effiziente Membran- und Vesikel-Bindung die basische Aminosäuresequenz **K²⁶³MLKKDK²⁶⁹**. Eine Mutation dieser Sequenz, durch Austausch aller Lysine und des Methionin-Restes gegen Alanin, reduziert sowohl die Bindung von PTEN an Phospholipid-Vesikel, als auch die biologische Aktivität des Enzyms (Downes et al., 2004). Die Aminosäuresequenz **K⁴⁵⁷ILIKNKK⁴⁶⁴** der PLC- β 2 ist für die PI-4,5-P₂-Bindung des Enzyms verantwortlich (Simoes et al., 1995). Innerhalb der Kinasedomäne der PI-3-Kinase γ fällt ebenfalls ein lysinreicher Sequenzabschnitt auf. Dieser Abschnitt **K⁸⁰⁰CKVMASKKK⁸⁰⁹** umfaßt auch die Lysinreste 807 und 808, die an der PI-4,5-P₂-Bindung der PI-3-Kinase γ beteiligt sein könnten. Das synthetische PI-4,5-P₂-bindende Peptid **K⁴⁵⁷ILIKNKK⁴⁶⁴** aus der PLC- β 2-Sequenz zeigt konzentrationsabhängig eine maximale Hemmung der PI-4,5-P₂-Bindung an PI-3-Kinase γ von ca. 65 %, wohingegen das synthetische Peptid **K⁸⁰⁰CKVMASKKK⁸⁰⁹** aus der PI-3-Kinase γ -Sequenz die PI-4,5-P₂-Bindung schon bei geringeren Konzentrationen hemmt und bei höherer Konzentration sogar eine komplette Aufhebung der PI-4,5-P₂-Bindung an PI-3-Kinase γ erreicht. Beide Peptide haben keinen Einfluß auf die minimale Bindung der PI-3-Kinase γ an ungeladene PC-Liposomen. Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die Vermutung, dass die lysinreiche Sequenz **K⁸⁰⁰CKVMASKKK⁸⁰⁹** der PI-3-Kinase γ in der Lage ist PI-4,5-P₂ zu binden und zum anderen, dass hier ein ähnlicher Mechanismus vorliegt, wie er schon für andere Polyphosphoinositid-bindende Proteine, wie z.B. MARCKS, beschrieben wurde (Wang et al., 2002).

Cytochrom C assoziiert bei neutralem pH-Wert mit Membranen, die saure Phospholipide enthalten. Diese Interaktion ist elektrostatischer Natur und sensitiv auf Änderungen der Ionenstärke und des pH-Wertes (Rytömaa und Kinnunen, 1994). Auch van Paridon und Mitarbeiter beschreiben die starke pH-Abhängigkeit der Phosphoinositidladung (van Paridon et al., 1986). Einmal an PI-3-Kinase γ gebundenes PI-4,5-P₂ läßt sich jedoch weder durch hohe Salzkonzentrationen (1 M NaCl), IP₃-Waschung des Protein-Lipid-Komplexes, noch durch pH-Wert-Erniedrigung wieder ablösen. Nur das Detergenz Triton X-100 kann das PI-4,5-P₂ wieder von der PI-3-Kinase γ trennen. Die Reversibilität der PI-4,5-P₂-Bindung nach Tritonentfernung an PI-3-Kinase γ zeigt, dass Triton nicht zur Denaturierung des Enzyms führt. Diese Befunde weisen darauf hin, dass PI-3-Kinase γ nicht ausschließlich über elektrostatische Wechselwirkungen an

anionische Phospholipide bindet, sondern dass auch hydrophobe Interaktionen an der Bindung beteiligt sind. Die Membranbindung anderer Proteine, wie der Tyrosinkinase Src und der cytosolischen PLA₂, erfordert neben elektrostatischen Interaktionen auch noch hydrophobe Insertionen (Murray et al., 1998; Perisic et al., 1998). Für das Vinculin ist ein solcher dualer Bindungsmechanismus durch Kristall-Struktur-Untersuchungen belegt worden (Pakolitsa, et al., 1999). Shirai und Mitarbeiter haben gefunden, dass PI-3-Kinase PI mit Distearinsäure nicht phosphorylieren kann (Shirai et al., 1999). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Fettsäureketten der Phospholipide einen Einfluß auf die Bindung an PI-3-Kinase γ haben könnten. Phosphoinositide enthalten überwiegend Stearin- und Arachidonsäure als Fettsäureketten. Anionische Phospholipide (PA und PS), die ungesättigte Fettsäureketten enthalten, binden stärker an PI-3-Kinase γ , als Lipide mit gesättigten Fettsäureketten. Die neutralen, nur schwach bindenden Lipide zeigen keine Fettsäure-Abhängigkeit (Kirsch et al., 2001). Die Anwesenheit von anionischen Phospholipid-Kopfgruppen und von ungesättigten Fettsäureketten reduziert die Packungsdichte und erleichtert so die Protein-Phospholipid-Interaktion (Buckland und Wilton, 2000).

PI-3-Kinase γ besitzt neben ihrer Lipidkinase-Aktivität auch Proteinkinase-Aktivität, die wir in unserer Arbeitsgruppe erstmals nachweisen konnten (Stoyanova et al., 1997). Sowohl für die Lipid- als auch die Proteinkinase-Aktivität muß PI-3-Kinase γ ATP binden. Lys⁸³² und Ser⁸⁰⁶ der PI-3-Kinase γ sind wahrscheinlich die Aminosäurereste, welche mit den α -bzw. β -Phosphatresten des ATP interagieren. In unmittelbarer Nachbarschaft von Ser⁸⁰⁶ liegen die Lysinreste 807 und 808, welche vermutlich mit dem 1-Phosphat der PI-4,5-P₂-Kopfgruppe eine ionische Wechselwirkung eingehen können (Walker et al., 1999). Der PI-3-Kinase-Inhibitor Wortmannin bindet kovalent an Lys⁸³² der PI-3-Kinase γ und hebt somit die ATP-Bindung und die Enzymaktivitäten komplett auf. Wird PI-3-Kinase γ vor Wortmanninzugabe mit PI oder PI-4,5-P₂ vorinkubiert, so kann die Wortmanninbindung in Abhängigkeit von der Phosphoinositid-Konzentration gehemmt werden (Stoyanova et al., 1997). Diese Befunde werfen die Frage nach der Beziehung zwischen Phospholipid-Bindung und den Enzymaktivitäten der PI-3-Kinase γ auf. Die neutralen Phospholipide PE und PC, die nahezu keine Bindung an PI-3-Kinase γ zeigen, haben keinen Einfluß auf die Enzym-Aktivitäten der PI-3-Kinase γ . Alle negativ geladenen PI-3-Kinase γ -bindenden Phospholipide können zeitabhängig sowohl die Lipid- als auch die Proteinkinase-

Aktivität der PI-3-Kinase γ hemmen, vorausgesetzt, die Lipidzugabe erfolgt vor der ATP-Zugabe. Möglicherweise behindert die Lipidbindung die anschließende ATP-Bindung, ähnlich wie die Wortmanninbindung (Stoyanova et al., 1997). Die Hemmung der PI-3-Kinase γ -Lipidkinase-Aktivität durch Lipidbindung wäre eine Erklärung dafür, daß auch in unstimulierten Zellen ein bestimmter Anteil des Enzym membranlokalisiert ist, man aber keine PI-3,4-P₂ und PI-3,4,5-P₃-Konzentrationen messen kann.

Nach Stimulation G-Protein gekoppelter Rezeptoren kann es zur p101-unabhängigen Aktivierung membrangebundener PI-3-Kinase γ kommen (Brock et al., 2003). Es ist denkbar, dass PI-3-Kinase γ nach Zellstimulation mit G $\beta\gamma$ assoziiert und dadurch eine Strukturänderung erfährt, die zur Lipidkinase-Aktivierung führt. Auch eine Funktion der Lipidkinase-inhibierten PI-3-Kinase γ als „Scaffold-Protein“, ähnlich wie im Herzen mit PDE3B, ist vorstellbar. Die Hemmung der Proteinkinase-Aktivität könnte ebenso in einer behinderten ATP-Bindung und/oder Konformations-Änderung der PI-3-Kinase γ durch die Lipidbindung begründet sein. Für PKC, cytosolische PLA₂ und PTEN werden Proteinphosphorylierungen und Autophosphorylierungen als Regulatoren der Membran-Dissoziation diskutiert (Feng et al., 2000; Das et al., 2003). Bei Czupalla und Mitarbeitern führt die Anwesenheit von PS-haltigen Lipid-Vesikeln und G $\beta\gamma$ zur Stimulation der Autophosphorylierung, wobei für alle Untersuchungen das rekombinante Heterodimer GST-p101/p110 γ eingesetzt wurde. Das Adapterprotein p101 bindet an den N-Terminus der PI-3-Kinase γ und bewirkt vermutlich eine Konformationsänderung des Enzyms, die zusammen mit G $\beta\gamma$ zur Aktivierung der Autophosphorylierung führen kann. Das Regulatorprotein Calponin kann mit seinem N-terminalen Fragment Proteine wie Aktin und Calmodulin, aber auch Phospholipide, binden (Fujii et al., 1995). In Abwesenheit von p101 ist es deshalb ebenso vorstellbar, dass der α -Helix-reiche N-Terminus der PI-3-Kinase γ in die Phospholipidbindung über Insertion in den Lipidbilayer involviert ist. PIP₂-Bindung an das Protein Epsin führt zur Membranpenetration der N-terminalen α -Helix und somit zur Verlangsamung der Membrandissoziation (Stahelin et al., 2003). Diese Umstände erklären die differenten Ergebnisse. Da bisher keine Funktion der Autophosphorylierung der PI-3-Kinase γ an Ser¹¹⁰¹ bekannt ist, wäre eine Rolle als elektrostatischer Schalter der Membrantranslokation des Enzyms denkbar.

Nachdem der Zusammenhang zwischen Lipidbindung und Enzym-Aktivitäten beim Wildtyp-Protein diskutiert wurde, soll nun diese Frage mit PI-3-Kinase γ -Mutanten

betrachtet werden. Dazu sind der N-terminale (Aminosäuren 37-773) und C-terminale Teil (Aminosäuren 773-1102) der PI-3-Kinase γ , sowie die Mutante K832R verwendet worden. Alle eingesetzten Proteine zeigen weder Lipid-noch Proteinkinase-Aktivität, binden aber PI-4,5-P₂ (Stoyanova et al., 1997; Kirsch et al., 2001). Eine N-terminale Verkürzung der PI-3-Kinase γ um 169 Aminosäuren führt zum nahezu kompletten Aktivitätsverlust, wohingegen eine Verkürzung um 144 Aminosäuren nur einen geringen Aktivitätsverlust aufweist, obwohl die katalytische Domäne C-terminal liegt (Krugmann et al., 1999). Anscheinend ist die N α 1-Helix der PI-3-Kinase γ (Aminosäuren 147-158) für die Enzymaktivität essentiell, möglicherweise durch Involierung in die Lipidbindung, die eine Voraussetzung für die Enzymatkatalse ist. Ein ähnliches Verhalten zeigen auch die Phospholipasen C- δ 1 und D, die ebenfalls von der katalytischen Domäne entfernt liegende Phospholipid-Bindungsstellen aufweisen müssen, um enzymatisch aktiv zu sein (Shimohama et al., 1998; Xie et al., 1998). Auch die Phosphatase PTEN benötigt eine Lipidbindungs-Domäne außerhalb der Phosphatase-Domäne zur Membranbindung (Das et al., 2003). Der N-terminale Teil der PI-3-Kinase γ (aa 37-773), welcher neben dem N-Terminus, die Ras-Bindungsdomäne, die C2-Domäne sowie die Helikale Domäne enthält, zeigt ca. 90 % der PI-4,5-P₂-Bindung des Wildtyp-Proteins. Diese hohe PI-4,5-P₂-Bindung ist möglicherweise durch mehrere N-terminale Lipidbindungsstellen, wie die diskutierte N α 1-Helix der PI-3-Kinase γ und die als potentielle Lipidbindungsdomäne beschriebene C2-Domäne, bedingt. Die PI-4,5-P₂-Bindungsfähigkeit des N-terminalen Fragments bestätigt, dass PI-3-Kinase γ ein ähnliches Verhalten zeigt, wie es für die Phospholipasen C- δ 1 und-D oder PTEN beschrieben wurde. Trotz fehlender Enzym-Aktivität kann die K832R-Mutante PI-4,5-P₂ analog dem Wildtyp-Enzym binden. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den Befunden, dass die PI-3-Kinase-Hemmer Wortmannin und LY 294002 nicht die PI-3-Kinase γ Rekrutierung oder Translokation an die Zellmembran hemmen (Al-Aoukaty et al., 1999; Merlot und Firtel, 2003). Da PI-3-Kinase γ über mindestens zwei PI-4,5-P₂-Bindungsstellen (N-und C-terminal) verfügt und jedes Bindungsmotiv vermutlich mehrere basische Aminosäuren enthält, ist die starke PI-4,5-P₂-Bindung trotz der K832R-Mutation verständlich (Simoes et al., 1995; Downes et al., 2004). Der C-terminale Teil der PI-3-Kinase γ , welcher nur die katalytische Domäne enthält, bindet nur ca. 40 % PI-4,5-P₂ im Vergleich zum Wildtyp (100 %). In der katalytischen Domäne liegt die Substratbindungsstelle, aber N-terminal

befinden sich ja möglicherweise zwei weitere Lipidbindungsstellen, was die höhere Lipidbindung im N-terminalen Teil gegenüber dem C-terminalen erklären könnte. Zusammenfassend kann man sagen, dass die PI-4,5-P₂-Bindung an PI-3-Kinase γ unabhängig von Protein- und Lipidkinase-Aktivität erfolgt und dass es außerhalb der katalytischen Domäne mindestens eine weitere PI-4,5-P₂-Bindungsstelle geben muß.

Daran anschließend wurde geprüft, ob der N- und C-terminale Teil der PI-3-Kinase γ an differente Phospholipide binden. Doch keiner der beiden PI-3-Kinase γ -Teile zeigt eine Präferenz für ein bestimmtes Phospholipid. Beide Teile binden die gleichen Phospholipide wie die Wildtyp PI-3-Kinase γ , das heißt die negativ geladenen Phospholipide PA, PS, PI, PI-4-P und PI-4,5-P₂ werden stark gebunden, wohingegen die neutralen Phospholipide PC und PE nur eine minimale Bindung zeigen. Auch ein N-terminales Fragment des Regulatorproteins Calponin bindet an die anionischen Phospholipide PA und PS, aber nicht an neutrales PC (Fujii et al., 1995). In Bezug auf die minimale PE- und PC-Bindung gibt es keinen Unterschied zwischen dem N- und C-terminalen Teil der PI-3-Kinase γ , im Gegensatz dazu werden alle negativ geladenen Phospholipide, analog dem PI-4,5-P₂, deutlich stärker (ca. 2-fach) vom N-terminalen Teil gebunden (Kirsch et al., 2001). Die Bindung des N-terminalen Teils an die anionischen Phospholipide entspricht 70-90 % der PI-4,5-P₂-Bindung des Wildtyp-Enzyms (PI-3-Kinase γ). Weitergehende Untersuchungen zum Charakter der Bindung (Einfluß hoher Salzkonzentrationen, Änderungen des pH-Wertes, Versuche zur Phospholipidablösung) ergeben keine prinzipiellen Unterschiede zwischen den beiden PI-3-Kinase γ -Teilen und zeigen mit der Wildtyp-PI-3-Kinase γ vergleichbare Ergebnisse. Sowohl N- als auch C-terminale Lipidbindung erfolgen offenbar über einen analogen Mechanismus. Initial kommt es offensichtlich zur unspezifischen elektrostatischen Interaktion des Enzyms mit der anionischen Phospholipid-Oberfläche, gefolgt von der Penetration in die Phospholipid-Schicht, wo es zur hydrophoben Wechselwirkung zwischen apolaren Aminosäuren und den Fettsäureketten der Phospholipide kommt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die PI-3-Kinase γ mit ihrer/n N-terminalen Bindungsseite(n) für anionische Phospholipide an Phospholipid-oberflächen bindet. Die Verankerung an der Membran ist eine Voraussetzung für die Phosphorylierung der membranlokalisierten Substrate durch die C-terminal gelegene katalytische Domäne. Dieser Modus erinnert an den Aktivierungsmechanismus von Phospholipasen. Seiten-gerichtete Mutagenese von R105A in der N-terminalen PH-

Domäne von Phospholipase C- δ 1 resultiert in einer Erniedrigung der Bindungsaffinität und einer Reduktion der Enzymaktivität (Shimohama et al., 1998). Volle Aktivität der Phospholipase D1 erfordert N- und C-terminal lokalisierte, konservierte katalytische Motive (Xie et al., 1998).

5.3. Zelluläre Lokalisation der PI-3-Kinase γ

Rekombinante GST-PI-3-Kinase γ aus Sf 9-Zellen kann nicht nur in vitro an Lipidmembranen binden, sondern ist auch in Membranfraktionen von Sf 9-Zellen zu finden (Leopoldt et al., 1998). Auch wir können ca. 30 % der GST-PI-3-Kinase γ -Aktivität von Sf 9-Zellen in der Membranfraktion nachweisen. Die Verteilung der katalytisch inaktiven K833R-Mutante zwischen Cytosol und Membran entspricht der Lokalisation des Wildtyps der PI-3-Kinase γ . Diese zelluläre Verteilung bestätigt die in vitro-Untersuchungen, in denen die katalytisch inaktive K833R-Mutante eine analoge PI-4,5-P₂-Bindung wie das Wildtyp-Enzym zeigt. Al-Aoukaty und Mitarbeiter finden in Natürlichen Killerzell-Membranen keine Hemmung der PI-3-Kinase γ -Rekrutierung durch Wortmannin, was darauf hindeutet, dass Kinase-aktive und -inaktive PI-3-Kinase γ gleiche Lokalisation zeigen (Al-Aoukaty et al., 1999). Der C-terminale Teil der PI-3-Kinase γ , welcher die katalytische Domäne enthält, ist ebenfalls entsprechend dem Wildtyp-Enzym zwischen Cytosol und Membran verteilt. Im Gegensatz dazu ist der N-terminale Teil primär in der Membranfraktion lokalisiert. Diese Verteilung ist in Übereinstimmung mit der deutlich stärkeren in vitro-Lipidbindung des N-terminalen Teils an anionische Phospholipide im Vergleich zum C-terminalen Teil. Prinzipiell gibt es für die zelluläre Membranbindung von Proteinen die Möglichkeit der Protein-Lipid und der Protein-Protein Interaktionen. Der N-terminale Teil der PI-3-Kinase γ besitzt mit dem N-Terminus (p101-Bindung), der Ras-Bindungsdomäne (Ras-Bindung) und der Helikalen Domäne (Ähnlichkeit mit der Protein-Protein-Interaktionsdomäne HEAT) drei potentielle Protein-Interaktions-Domänen und mit der C2-Domäne eine beschriebene Lipidbindungs-Domäne (Walker et al., 1999). Zunehmend wird eine Doppelfunktion dieser Domänen als Lipid- und Protein-Bindungsstelle diskutiert. Die C2-Domäne der PKC kann über eine Phosphatidylserinbrücke auch an Substratproteine binden (Mochly-Rosen und Gordon, 1998). Kürzlich ist für die C2-Domäne der PKC δ eine direkte Bindung an Phosphotyrosin-Peptide beschrieben worden (Benes et al.,

2005). In Protein-Protein oder Protein-Phospholipid-Interaktionen sind auch die PH-Domänen involviert. So kann die PH-Domäne der Phospholipase C sowohl Phospholipide als auch G-Proteine binden (Philip et al., 2002). Neben den G $\beta\gamma$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine bindet die PH-Domäne der Bruton's Tyrosinkinase (Btk) auch verschiedene PKC-Isoformen (Fukuda et al., 1996). Die FYVE-Domäne des „Early Endosome Antigen 1“ (EEA1) kann außer PI-3-P zusätzlich den Regulationsfaktor der Endosomenfusion Rab5 binden. Auf Grund dieser Befunde ist auch für die Domänen des N-terminalen Teils der PI-3-Kinase γ eine Doppelfunktion als Protein- und Lipidbindungsdomäne denkbar, was die starke Phospholipid- und Zellmembran-Bindung erklären könnte.

In HEK 293-Zellen, die mit PI-3-Kinase γ allein transfiziert sind, lässt sich ebenfalls Protein- und Enzymaktivität in der Membranfraktion detektieren. Die PI-3-Kinase γ -Membrananteile sind hinsichtlich Proteinmenge und Enzymaktivität mit denen in Sf 9-Zellen vergleichbar. Dieses Ergebnis bestätigt, dass auch GST-freie PI-3-Kinase γ nach Überexpression an zelluläre Membranen binden kann und die Membranbindung in Sf 9-Zellen nicht etwa durch eine Konformationsänderung durch N-terminal gebundenes GST verursacht ist.

Für endogene PI-3-Kinase γ in U937-Zellen beschreiben Stephens und Mitarbeiter eine überwiegend cytosolische Lokalisation, aber auch eine signifikante Menge membranassozierten Enzyms (Stephens et al., 1994). Wir finden in unstimulierten U937-Zellen nach FKS-Entzug auch PI-3-Kinase γ in der Membranfraktion und den überwiegenden Anteil im Cytosol. Stimuliert man diese Zellen wieder mit FKS, dann erhöht sich der PI-3-Kinase γ Anteil in der Membranfraktion. Zellen, die ständig in FKS-haltigem Medium inkubiert werden, zeigen eine annähernde Gleichverteilung der PI-3-Kinase γ zwischen Cytosol und Membranfraktion. Die Lipidkinase-Aktivität korreliert mit der Verteilung der PI-3-Kinase γ -Menge. In humanen Neutrophilen und Natürlichen Killerzellen kann nach Zellstimulation ebenfalls vermehrt PI-3-Kinase γ in der Membranfraktion detektiert werden (Naccache et al., 2000; Al-Aoukaty et al., 1999). Nach Stimulation Natürlicher Killerzellen mit dem Chemokin RANTES kann membranrekrutierte PI-3-Kinase γ mit G $\beta\gamma$ coimmunpräzipitiert werden. Dies deutet darauf hin, dass in die Membranbindung der PI-3-Kinase γ nach Zellstimulation auch Protein-Protein-Interaktionen involviert sind.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der PI-3-Kinase-Hemmer Wortmannin die PI-3-Kinase γ -Rekrutierung an die Membranen Natürlicher Killerzellen nicht hemmt (Al-Aoukaty et al., 1999), überprüften wir die zelluläre Lokalisation der PI-3-Kinase γ in Abhängigkeit von verschiedenen Wortmanninkonzentrationen. Unsere Ergebnisse bestätigen, dass die PI-3-Kinase γ in U937-Zellen eine von der Enzymaktivität unabhängige Lokalisation zeigt. Da bei der höchsten eingesetzten Wortmanninkonzentration die Lipidkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ nahezu komplett gehemmt ist, dürfte es sicher sein, dass die Membranbindung aktivitätsunabhängig erfolgen kann.

Retinoide sind dafür bekannt, dass sie Vorgänge wie Apoptose, zelluläres Wachstum oder Differenzierung regulieren können. In U937-Zellen löst Retinsäure Wachstumshemmung und Differenzierung dieser humanen Leukämiezell-Linie zu makrophagenähnlichen Zellen aus. Behandlung von U937-Zellen mit All-Trans-Retinsäure resultiert in einer verstärkten Gen-Expression der PI-3-Kinase γ , führt aber zu keiner Beeinflussung der PI-3-Kinasen β und δ , sowie der Adapterproteine p85 und p101. Die verstärkte Expression der PI-3-Kinase γ durch Retinsäure korreliert mit einer Erhöhung der PI-3-Kinase γ Lipidkinase-Aktivität (Baier et al., 1999). Die Retinsäure-induzierte PI-3-Kinase γ in U937 Zellen verteilt sich anteilmäßig auf Cytosol, Kern und Membranfraktion. Wir finden in allen genannten Fraktionen eine Erhöhung der Menge und Aktivität der PI-3-Kinase γ um denselben Faktor. Dies deutet darauf hin, dass die zelluläre PI-3-Kinase γ -Verteilung offenbar unabhängig von der Expressionsmenge ist.

Das ist auch ein weiterer Hinweis darauf, dass offenbar in dieser Zelllinie p101 für die Membranbindung des Enzyms keine entscheidende Rolle spielt.

Die Membranlokalisation der PI-3-Kinase γ in den diskutierten Zellversuchen ist vermutlich das Resultat von Protein- und Lipid-Interaktionen. Diese Untersuchungen geben aber noch keinen direkten Hinweis auf die unmittelbare Beteiligung anionischer Phospholipide an der Membranbindung der PI-3-Kinase γ . Die Stimulation der Serin/Threonin-Kinase Akt in intakten Zellen kann durch Zugabe exogener PI-3,4-P₂-Vesikeln ausgelöst werden. PI-3-Kinaseaktivität ist hierbei nicht erforderlich, was eine Zellbehandlung mit Wortmannin zeigt (Franke et al., 1997). Auch eine Erhöhung der Zellmobilität durch PKC ist in NIH 3T3 Fibroblasten nach exogener PI-3,4,5-P₃-Zugabe nachweisbar (Derman et al., 1997). Diese Ergebnisse zeigen, dass exogen auf Zellen gegebene Phospholipid-Vesikel mit der Plasmamembran lebender Zellen fusionieren und zelluläre Reaktionen auslösen können. Um einen Hinweis auf die mögliche direkte

Beteiligung anionischer Phospholipide an der Membranlokalisation der PI-3-Kinase γ zu bekommen, inkubierten wir U937-Zellen parallel mit fluoreszenzmarkierten PC- und Phosphoinositid/PS-Liposomen. Beide Liposomen werden von den Zellen aufgenommen und sind in Membranen, im Kern und in geringem Anteil auch im Cytosol zu finden. Der Einbau der neutralen PC-Liposomen führt zu keiner Lokalisationsänderung der PI-3-Kinase γ , wohingegen nach Einbau der anionischen Phospholipide die PI-3-Kinase γ -Menge in der Membranfraktion zunimmt. Analog verhält sich die Lipidkinase-Aktivität, die nach PC-Zusatz keinerlei Änderungen in den Fraktionen zeigt. Die anionischen Phospholipide bewirken dagegen einen Anstieg der PI-3-Kinase γ Lipidkinase-Aktivität in der Membranfraktion, sowie proportional dazu einen Aktivitätsverlust im Cytosol. Diese Ergebnisse beweisen, dass PI-3-Kinase γ auch in vivo an anionische Phospholipide binden kann.

Auf Lipid-Interaktionen als Bindungsmechanismus weist auch die verstärkte Membranlokalisation der PI-3-Kinase γ nach Retinsäurebehandlung hin. Denn Retinsäure führt zum Anstieg der PI-3-Kinase γ , aber nicht zur p101-Erhöhung. Auch die nahezu ausschließliche Membranlokalisation des N-terminalen Teils der PI-3-Kinase γ in Sf 9-Zellen spricht für diesen Bindungsmechanismus, wohingegen die Co-Immunpräzipitation der membranrekrutierten PI-3-Kinase γ mit G β / γ nach Chemokinstimulation auf eine Protein-Protein-Interaktion hinweist (Al-Aoukaty et al., 1999). Für Protein-Interaktionen als zusätzlichen Mechanismus der PI-3-Kinase γ -Membranbindung nach Zellstimulation sprechen auch die Versuche von Brock und Mitarbeitern. Nach Transfektion von HEK-Zellen mit G β / γ , p101 und PI-3-Kinase γ kommt es zur Bindung der PI-3-Kinase γ an die Zellmembran (Brock et al., 2003). Die gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass PI-3-Kinase γ über Protein-Lipid- und Protein-Protein-Interaktionen an Zellmembranen binden kann. Dabei könnten die Domänen der PI-3-Kinase γ eine Doppelfunktion als Protein- und Lipidbindungs-Domäne besitzen. In unstimulierten Zellen oder bei Abwesenheit assoziierender Proteine könnte PI-3-Kinase γ über Phospholipid-Interaktion an Membranen binden, was nach unseren Versuchen eine Aktivitätshemmung des Enzyms zur Folge haben könnte. Dafür sprechen unsere in vitro Versuche nach Lipidvorinkubation sowie die Tatsache, dass auch in unstimulierten Zellen ein signifikanter Anteil der PI-3-Kinase γ membranassoziiert, aber kein PI-3,4,5-P₃ nachweisbar ist. Es ist denkbar, dass diese membrangebundene PI-3-Kinase γ bei Anwesenheit von Adapterproteinen auch Protein-

Interaktionen eingehen kann. PI-3-Kinase γ könnte also, wie im Fall der PDE3B-Assoziation im Herzen, Funktionen als „Scaffold“-Protein ausüben. Für diese Funktion ist die Kinaseaktivität nicht zwingend erforderlich. Auch kann es nach Zellstimulation durch Proteinbindungen an Signalproteine zur Konformationsänderung und schnellen Aktivierung der PI-3-Kinase γ kommen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die unterschiedlichen Ergebnisse der *in vitro* Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ in Ab- und Anwesenheit der PI-3-Kinase γ bindenden Proteine G β / γ und p101. Wir testeten die Proteinkinase-Aktivität der PI-3-Kinase γ in Abwesenheit anderer Proteine nach Vorinkubation mit anionischen Phospholipiden und fanden eine starke Inhibierung der Enzymaktivität. Czupalla und Mitarbeiter untersuchten die Proteinkinaseaktivität in Anwesenheit von Phospholipiden, aber auch unter Zugabe von p101 und G β / γ . Sie fanden im Gegensatz zu uns eine Aktivierung der Enzymaktivität, welche in der Proteinzugabe begründet sein muß.

6. Zusammenfassung

PI-3-Kinase γ ist an vielfältigen zellulären Prozessen wie Neutrophilen-Migration, T-Zell-Proliferation, Mastzell-Degranulation und Herzmyozyten-Kontraktion beteiligt. Zur Steuerung dieser Zellfunktionen tragen neben der Lipidkinase-Aktivität, auch die Proteinkinase-Aktivität und direkte Protein-Interaktionen der PI-3-Kinase γ bei. Nur für die Lipidkinasefunktion des Enzyms besteht die Notwendigkeit, an die Zellmembran, den Ort der Substratlokalisation, zu binden. Der Membranbindungsmechanismus der PI-3-Kinase γ , besonders in Abwesenheit des Adapterproteins p101, ist noch ungeklärt. Prinzipiell können Enzyme über Protein- und Lipidinteraktionen an zelluläre Membranen binden. Ziel dieser Arbeit war es eine mögliche Membranbindung der PI-3-Kinase γ über Lipidassoziation zu untersuchen.

Für in vitro-Untersuchungen wurde GST-PI-3-Kinase γ in Sf 9-Zellen exprimiert, gereinigt und in einen Lipidbindungstest mit unilamellaren Mischliposomen definierter Größe eingesetzt. Es zeigte sich, dass PI-3-Kinase γ an anionische Substrat- und Nicht-Substrat-Phospholipide binden kann, wohingegen neutrale Phospholipide nahezu nicht gebunden werden. Die Membranassoziation erfolgt offenbar über ionische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Phospholipid-Kopfgruppen und positiv geladenen Aminosäuren der PI-3-Kinase γ . Die Stabilisierung dieser Bindung erfolgt dann wahrscheinlich durch Penetration der PI-3-Kinase γ in den Lipidbilayer über hydrophobe Wechselwirkung zwischen apolaren Aminosäuren und den Fettsäureketten der Phospholipide.

Um festzustellen, ob es außerhalb der katalytischen Domäne weitere Phospholipidbindungsstellen gibt, wurden der N- und C-terminale Teil der PI-3-Kinase γ ebenfalls als GST-Fusionsproteine in Sf 9-Zellen hergestellt und in den Lipidbindungstest eingesetzt. Es zeigte sich, dass es wahrscheinlich neben der C-terminalen Bindungsstelle in der katalytischen Domäne, noch mindestens eine weitere N-terminale Bindungsstelle geben muß. Weder der N- noch der C-terminale Teil ließen eine Präferenz für ein bestimmtes Phospholipid erkennen. In beiden Teilen erfolgt die Phospholipid-Interaktion offenbar nach demselben Prinzip. Zunächst kommt es zu unspezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen, dann erfolgt eine hydrophobe Insertion.

Unter Einsatz der genannten GST-Fusionsproteine und der katalytisch inaktiven K833R-Mutante untersuchten wir den Zusammenhang zwischen Phospholipidbindung und Enzymaktivität. Der phospholipidbindende N-terminale Teil erwies sich als essentiell für die PI-3-Kinase γ -Aktivität. Vorinkubation der PI-3-Kinase γ mit Phospholipiden führte zur

Inhibierung der Lipid-und Protein-Kinaseaktivität. Die Phospholipidbindung benötigt kein katalytisch aktives Enzym, da weder N-terminaler oder C-terminaler PI-3-Kinase γ -Teil, noch die K833R-Mutante Enzymaktivität zeigen, aber trotzdem Phospholipide binden können.

Zur Überprüfung der in vitro-Befunde wurde die zelluläre Lokalisation der verwendeten GST-Fusionsproteine in Sf 9-Zellen überprüft. Die Zelllysate wurden über Zentrifugation in Kern-, Membran- und Cytosolfraction aufgetrennt. Alle eingesetzten GST-Fusionsproteine zeigten Membranbindung, wobei der in vitro sehr stark phospholipidbindende N-terminale Teil der PI-3-Kinase γ fast ausschließlich in der Membranfraction zu finden war. Die zelluläre Lokalisation korrelierte prinzipiell mit der in vitro-Phospholipidbindungsfähigkeit der GST-Fusionsproteine.

Zur Bestätigung der Bindung der PI-3-Kinase γ an Phospholipidschichten wurde die Lokalisation des konstitutiv exprimierten Enzyms in der humanen Leukämie-Zelllinie U937 untersucht. Dabei wurde gefunden, dass etwa die Hälfte des Enzyms offenbar permanent an die Zellmembran gebunden ist. Dieser Befund steht ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den in vitro-Experimenten.

Inaktivierung durch Wortmannin oder Induktion der PI-3-Kinase γ durch Retinsäure verändern nicht das Lokalisationsverhalten des Enzyms in der Zelle. Im Gegensatz dazu war eine FKS-abhängige Translokation der PI-3-Kinase γ zu beobachten. Nach FKS-Entzug wurde in den Zellkulturen beobachtet, dass signifikant weniger PI-3-Kinase γ in der Membranfraction, im Cytosol jedoch eine größere Enzymmenge, verglichen mit der Verteilung in FKS-Anwesenheit, gefunden wurde. Dieser Effekt konnte durch FKS-Zugabe rückgängig gemacht werden.

Einbau exogen zugegebener anionischer Phospholipid-Vesikel in die Zellmembranen bewirkt eine verstärkte Membranlokalisation der PI-3-Kinase γ .

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass PI-3-Kinase γ in vitro und in vivo an anionische Phospholipidmembranen binden kann. Auch in unstimulierten Zellen, in Abwesenheit potentieller Rezeptor-Agonisten, ist ein bestimmter Anteil des Enzyms membrangebunden. Die in der Literatur beschriebenen Aktivierungen durch $G\beta\gamma$ und p101 würden demnach keine Rekrutierung des Enzyms aus dem Cytosol an die Zellmembran voraussetzen, sondern könnten am permanent membrangebundenen Enzym erfolgen. Ebenso wäre denkbar, dass die Membranfraction der PI-3-Kinase γ eine aktivitätsunabhängige Scaffold-Funktion ausübt.

7. Literaturverzeichnis

Al-Aoukaty, A., Rolstad, B., and Maghazachi, A.A. (1999) Recruitment of Pleckstrin and Phosphoinositide 3-Kinase γ into the Cell Membranes, and their Association with G $\beta\gamma$ after Activation of NK Cells with Chemokines. *The Journal of Immunology*, **162**, 3249-3255.

Alloatti, G., Marcantoni, A., Levi, R., Gallo, M.P., Sorbo, L.D., Patrucco, E., Barberis, L., Malan, D., Azzolino, O., Wymann, M.P., Hirsch, E., and Montrucchio, G. (2005) Phosphoinositide 3-kinase γ controls autonomic regulation of the mouse heart through G $_i$ -independent downregulation of cAMP level. *FEBS Letters*, **579**, 133-140.

Asano T., Kanda, A., Katagiri, H., Nawano, M., Ogihara, T., et al. (2000) p110 β is upregulated during differentiation of 3T3-L1 cells and contributes to the highly insulin-responsive glucose transport activity. *J. Biol. Chem.*, **275**, 17671-17676.

Bacqueville, D., Deleris, P., Mendres, C., Pieraggi, M.-T., Chap, H., Guillon, G., Perret, B., and Breton-Douillon, M. (2001) Characterization of a G Protein-activated Phosphoinositide 3-Kinase in vascular smooth muscle cell nuclei. *J. Biol. Chem.*, **276**, 22170-22176.

Baier, R., Bondeva, T., Klinger, R., Bondev, A., and Wetzker, R. (1999) Retinoic Acid Induces Selective Expression of Phosphoinositide 3-Kinase γ in Myelomonocytic U937 Cells. *Cell Growth & Differentiation*, **10**, 447-456.

Barbier, M., Attoub, S., Calvez, R., Laffargue, M., Jarry, A., Mareel, M., Altruda, F., Gespach, C., Wu, D., Lu, B., Hirsch, E., and Wymann, M.P. (2001) Weakening link to colorectal cancer? *Nature*, **413**, 769.

Baud, V., and Karin, M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.*, **11**, 372-377.

Benes, C.H., Wu, N., Elia, A.E.H., Dharia, T., Cantley, L.C., and Soltoff, S.P. (2005) The C2 Domain of PKC δ is a Phosphotyrosine Binding Domain. *Cell*, **121**, 271-280.

Bi, L., Okabe, I., Bernard, D., and Nussbaum, R. (2002) Early embryonic lethality in mice deficient in the p110 β catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mammalian Genome*, **13**, 169-172.

Bi, L., Okabe, I., Bernard, D., Wynshaw-Boris, A., and Nussbaum, R. (1999) Proliferation Defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110 α subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, **274**, 10963-10968.

Bondeva, T., Pirola, L., Bulgarelli-Leva, G., Rubio, I., Wetzker, R., Wymann, M.P. (1998) Bifurcation of Lipid and Protein Kinase Signals of PI3K γ to the Protein Kinases PKB and MAPK. *Science*, **282**, 293-296.

Brock, C., Schaefer, M., Reusch, H.P., Czupalla, C., Michalke, M., Spicher, K., Schultz, G., and Nürnberg, B. (2003) Roles of G $\beta\gamma$ in membrane recruitment and activation of p110 γ /p101 phosphoinositide 3-kinase γ . *J Cell Biol.*, **160**, 89-99.

Buckland, A.G., and Wilton, D.C. (2000) Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions. *BBA*, **1483**, 199-216.

Burden, L.M., Rao, V.D., Murray, D., Ghirlando, R., Doughman, S.D., Anderson, R.A., and Hurley, J.H. (1999) The flattened face of Type II β Phosphatidylinositol Phosphate Kinase binds acidic phospholipid membranes. *Biochemistry*, **38**, 15141-15149.

Carpenter, C.L., Auger, K.R., Duckworth, B.C., Hou, W.M., Schaffhausen, B.S., and Cantley, L.C. (1993) A tightly associated serine/threonine protein kinase regulates phosphoinositide 3-kinase activity. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 1657-1665.

Chen, D., Mauvais-Jarvis, F., Bluher, M., Fisher, S.J., Jozsi, A., Goodyear, L.J., Ueki, K. and Kahn, C.R. (2004) p50a/p55a Phosphoinositide 3-Kinase Knockout mice exhibit enhanced insulin sensitivity. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 320-329.

Cifuentes, M.E., Delaney, T., and Ribecchi, M.J. (1994) D-myo-Inositol 1,4,5-Trisphosphate inhibits binding of Phospholipase C- δ 1 to Bilayer Membranes. *J. Biol. Chem.*, **269**, 1945-1948.

Clapham, D.E., and Neer, E.J. (1993) New roles for G-protein $\beta\gamma$ dimmers in transmembrane signalling. *Nature*, **365**, 403-406.

Clayton, E., Bardi, G., Bell, S.E., Chantry, D., Downes, C.P., Gray, A., Humphries, L.A., Rawlings, D., Reynolds, H., Vigorito, E., and Turner, M. (2002) A crucial role for the p110 δ subunit of Phosphatidylinositol 3-kinase in B Cell development and activation. *J. Exp. Med.*, **196**, 753-763.

Coffer, P.J., Jin, J., and Woodgett, J.R. (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem. J.*, **335**, 1-13.

Crackower, M.A., Oudit, G.Y., Kozieradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J., Sah, R., Cheng, H.-Y.M., Rybin, V.O., Lembo, G., Fratta, L., Oliveira-dos-Santos, A.J., Benovic, J.L., Kahn, C.R., Izumo, S., Steinberg, S.F., Wymann, M.P., Backx, P.H., and Penninger, J.M. (2002) Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell*, **110**, 737-749.

Czapalla, C., Culo, M., Müller, E-C., Brock, C., Reusch, H.P., Spicher, K., Krause, E., and Nürnberg, B. (2003) Identification and Characterization of the Autophosphorylation Sites of Phosphoinositides 3-Kinase Isoforms β and γ . *J. Biol. Chem.*, **278**, 11536-11545.

Das, S., Dixon, J.E., and Cho, W. (2003) Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *PNAS*, **100**, 7491-7496.

Davletov, B.A., and Südhof, T.C. (1993) A Single C₂ Domain from Synaptotagmin I Is Sufficient for High Affinity Ca²⁺ / Phospholipid Bindung. *J. Biol. Chem.*, **268**, 26386-26390.

Derman, M.P., Toker, A., Hartwig, J.H., Spokes, K., Falck, J.R., Chen, C.-S., Cantley, L.C., and Cantley, L.G. (1997) The lipid products of Phosphoinositide 3-Kinase increase cell motility through Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.*, **272**, 6465-6470.

Dhand, R., Hiles, I., Panayotou, G., Roche, S., Fry, M.J., Gout, I., Totty, N.F., Truong, O., Vicendo, P., Yonezawa, K., and Waterfield, M.D. (1994) PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *EMBO J.*, **13**, 522-533.

Dohlmann, H.G., Thorner, J., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 653-688.

- Downes, C.P., Walzer, S., McConnachie, G., Lindsay, Y., Batty, I.H., and Lesile, N.R. (2004) Acute regulation of the tumour suppressor phosphatase, PTEN, by anionic lipids and reactive oxygen species. *Biochemical Society Transactions*, **32**, 338-342.
- Escobedo, J.A., Navankasattusas, S., Kavanaugh, W.M., Milfay, D., Fried, V.A., Williams L.T. (1991) cDNA cloning of a novel 85 kD protein that has SH2 domains and regulates binding of PI3-kinase to the PDGF β -receptor. *Cell*, **65**, 75-82.
- Evans, R. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor subfamily. *Science*, **240**, 889-895.
- Feng, X., Becker, K.P., Stribling, S.D., Peters, K.G., and Hannun, Y.A. (2000) Regulation of receptor-mediated Protein Kinase C membrane trafficking by Autophosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **275**, 17024-17034.
- Foukas, L.C. and Shepherd, P.R. (2004) eIF4E binding protein 1 and H-Ras are novel substrates for the protein kinase activity of class-I phosphoinositide 3-kinase. *BBRC*, **319**, 541-549.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., Toker, A. (1997) Direct Regulation of the Akt Proto-Oncogene Product by Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science*, **275**, 665-668.
- Fruman, D.A., Mauvais-Jarvis, F., Pollard, D.A., Yballe, C.M., Brazil, D., Bronson, R.T., Kahn, C.R. and Cantley, L.C. (2000) Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 α . *Nat. Genet.*, **26**, 379-382.
- Fruman, D.A., Snapper, S.B., Yballe, C.M., Davidson, L., Yu, J.Y., Alt, F.W. and Cantley, L.C. (1999) Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85 α . *Science*, **283**, 393-397.
- Fujii, T., Yamana, K., Ogoma, Y., and Kondo, Y. (1995) Interaction of Calponin with Phospholipids. *J.Biochem.*, **117**, 999-1003.
- Fukuda, M., Kojima, T., Kabayama, H., and Mikoshiba, K. (1996) Mutation of the Pleckstrin Homology Domain of Bruton's Tyrosine Kinase in immunodeficiency impaired Inositol 1,3,4,5-Tetrakisphosphate binding capacity. *J. Biol. Chem.*, **271**, 30303-30306.
- Garbers, D.L., Koesling, D., and Schultz, G. (1994) Guanylyl cyclase receptors. *Mol. Biol. Cell*, **5**, 1-5.
- Groves, M.R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B.A., and Barford, D. (1999) The structure of the Protein Phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 Tandemly Repeated HEAT Motifs. *Cell*, **96**, 99-110.
- Gudermann, T. Nürnberg, B., and Schultz, G. (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J. Mol. Med.*, **73** 51-63.
- Gutkind, J.S. (1998) The Pathways Connecting G Protein-coupled Receptors to the Nucleus through Divergent Mitogen-activated Protein Kinase Cascades. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1839-42
- Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R.D., Krishna, U.M., Falck, J.R., White, M.A., and Broek, D. (1998) Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science*, **23**, 558-560.

Hegewald, H. (1996) One-Dimensional Thin-Layer Chromatography of all known D-3 and D-4 Isomers of Phosphoinositides. *Analytical Biochemistry*, **242**, 152-155.

Hepler, J., and Gilman, A.G. (1992) G proteins. *Trends Biochem.Sci.*, **17**, 383-387.

Hirsch, E., Bosco, O., Tropel, P., Laffargue, M., Calvez, R., Altruda, F., Wymann, M., and Montrucchio, G. (2001) Resistance to thromboembolism in PI3K γ -deficient mice. *FASEB J.*, **15**, 2019-2021.

Hirsch, E., Katanaev, V.L., Garlanda, C., Azzolino, O., Pirola, L., Silengo, L., Sozzoni, S., Mantovani, A., Altruda, F., and Wymann, M. (2000) Central role for G-Protein-coupled Phosphoinositide 3-kinase γ in inflammation. *Science*, **287**, 1049-1053.

Hooshmand-Rad, R., Hajkova, L., Klint, P., Karlsson, R., Vanhaesebroeck, B., Claesson-Welsh, L. and Heldin, C.-H. (2000) The PI 3-kinase isoforms p110(alpha) and p110(beta) have different roles in PDGF-and insulin-mediated signalling. *J.Cell Sci.*, **113**, 207-214.

Iniguez-Lluhi, J., Kleuss, C., and Gilman, A.G. (1993) The importance of G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Trends Cell. Biol.*, **3**, 230-236.

Janmey, P.A., Lamb, J., Allen, P.G., and Matsudaira, P.T. (1992) Phosphoinositide-binding peptides derived from the sequences of Gelsolin and Villin. *J. Biol. Chem.*, **267**, 11818-11823.

Jenco, J.M., Becker, K.P., and Morris, A.J. (1997) Membrane-binding properties of phospholipase C- β_1 and phospholipase C- β_2 : role of the C-terminus and effects of phosphoinositides, G-proteins and Ca²⁺. *Biochem. J.*, **327**, 431-437.

Jou, S.-T., Carpino, N., Takahashi, Y., Piekorz, R., Chao, J.-R., Carpino, N., Wang, D., and Ihle, J.N. (2002) Essential, nonredundant role for the Phosphoinositide 3-kinase p110 δ in signalling by the B-Cell-Receptor Complex. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 8580-8591.

Kirsch, C., Wetzker, R., and Klinger, R. (2001) Anionic Phospholipids are involved in membrane targeting of PI 3-Kinase γ . *BBRC*, **282**, 691-696.

Koyasu, S. (2003) The role of PI3K in immune cells. *Nature Immunologie*, **4**, 313-319.

Koyasu, S. (2004) Role of class IA phosphoinositide 3-kinase in B lymphocyte development and functions. *Biochemical Society Transactions*, **32**, 320-325.

Krugmann, S., Cooper, M.A., Williams, D.H., Hawkins, P.T., and Stephens, L.R. (2002) Mechanism of the regulation of type IB phosphoinositide 3OH-kinase by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Biochem. J.*, **362**, 725-731.

Krugmann, S., Hawkins, P.T., Pryer, N., and Braselmann, S. (1999) Characterizing the Interactions between the two subunits of the p101/p110 γ Phosphoinositide 3-Kinase and their role in the activation of this enzyme by G $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17152-17158.

Kular, G., Loubtchenkov, M., Swigart, P., Whatmore, J., Ball, A., Cockcroft, S., and Wetzker, R. (1997) Co-operation of phosphatidylinositol transfer protein with phosphoinositide 3-kinase γ in the formylmethionyl-leucylphenylalanine-dependent production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in human neutrophils. *Biochem. J.*, **325**, 299-301.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laffargue, M., Calvez, R., Finan, P., Trifilieff, A., Barbier, M., Altruda, F., Hirsch, E., and Wymann, M.P. (2002) Phosphoinositide 3-Kinase γ is an essential amplifier of Mast Cell Function. *Immunity*, **16**, 441-451.
- Lawe, D.E., Patki, V., Heller-Harrison, R., Lambright, D., and Corvera, S. (2000) The FYVE Domain of Early Endosome Antigen 1 is required for both Phosphatidylinositol 3-Phosphate and Rab5 binding. *J. Biol. Chem.*, **275**, 3699-3705.
- Lemmon, M.A. (2003) Phosphoinositide Recognition Domains. *Traffic*, **4**, 201-213.
- Leopoldt, D., Hanck, T., Exner, T., Maier, U., Wetzker, R., and Nürnberg, B. (1998) G $\beta\gamma$ stimulates Phosphoinositide 3-Kinase- γ by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J. Biol. Chem.*, **273**, 7024-7029.
- Li, Z., Jiang, H., Xie, W., Zhang, Z., Smrcka, A.V., and Wu, D. (2000) Roles of PLC- β 2 and - β 3 and PI3K γ in Chemoattractant-mediated signal transduction. *Science*, **287**, 1046-1049.
- Liebmann, C., (2001) Bradykinin signalling to MAP kinase: Cell-specific connections versus principle mitogenic pathways. *Biol. Chem.*, **382**, 49-55.
- Lupia, E., Goffi, A., De Giuli, P., Azzolino, O., Bosco, O., Patrucco, E., Vivaldo, M.C., Ricca, M., Wymann, M.P., Hirsch, E., Montrucchio, G., and Emanuelli, G. (2004) Ablation of Phosphoinositide 3-Kinase- γ reduces the severity of acute pancreatitis. *American Journal of Pathology*, **165**, 2003-2011.
- Luttrell, L.M., Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Luttrell, D.K., Lefkowitz, R.J., (1997) G $\beta\gamma$ -subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*, **272**, 4637-4644.
- Macrez, N., Mironneau, C., Carricaburu, V., Quignard, J.-F., Babich, A., Czupalla, C., Nürnberg, B., and Mironneau, J. (2001) Phosphoinositide 3-Kinase Isoforms selectively couple receptors to vascular L-Type Ca²⁺ Channels. *Circ. Res.*, **89**, 692-699.
- Maier, U., Babich, A., and Nürnberg, B. (1999) Roles of non-catalytic subunits in G $\beta\gamma$ -induced activation of class I Phosphoinositide 3-Kinase Isoforms β and γ . *J. Biol. Chem.*, **274**, 29317-29317.
- Merlot, S., and Firtel, R.A. (2003) Leading the way: directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signalling pathways. *Journal of Cell Science*, **116**, 3471-3478.
- Metjian, A., Roll, R.L., Ma, A.D., and Abrams, C.S. (1999) Agonists cause nuclear Translocation of Phosphatidylinositol 3-Kinase γ . *J. Biol. Chem.*, **274**, 27943-27947.
- Mochly-Rosen, D., and Gordon, A.S. (1998) Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB Journal*, **12**, 35-42.
- Mosior, M., McLaughlin, S. (1992) Electrostatics and reduction of dimensionality produce apparent cooperativity when basic peptides bind to acidic lipids in membranes. *BBA*, **1105**, 185-187.

Murray, D., Arbuzova, A., Hangyas-Mihalyne, G., Gambhir, A., Ben-Tal, N., Honig, B., and McLaughlin, S. (1999) Electrostatic Properties of membranes containing acidic lipids and adsorbed basic peptides: Theory and Experiment. *Biophysical Journal*, **77**, 3176-3188.

Murray, D., Hermida-Matsumoto, L., Buser, C.A., Tsang, J., Sigal, C.T., Ben-Tal, N., Honig, B., Resh, M.D., and McLaughlin, S. (1998) Electrostatics and the membrane association of Src: Theory and Experiment. *Biochemistry*, **37**, 2145-2159.

Naccache, P.H., Levasseur, S., Lachance, G., Chakravarti, S., Bourgoin, S.G., and McColl, S.R. (2000) Stimulation of human Neutrophils by chemotactic factors is associated with the activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase γ . *J. Biol. Chem.*, **275**, 23636-23641.

Naga Prasad, S.V., Barak, L.S., Rapacciuolo, A., Caron, M.G., and Rockman, H.A. (2001) Agonist-dependent Recruitment of Phosphoinositide 3-Kinase to the Membrane by β -Adrenergic Receptor Kinase 1. *J. Biol. Chem.*, **276**, 18953-18959.

Nombela-Arrieta, C., La calle, R.A., Montoya, M.C., Kunisaki, Y., Megias, D., Marques, M., Carrera, A.C., Manes, S., Fukui, Y., Martinez-A, C., and Stein, J.V. (2004) Differential Requirements for DOCK2 and Phosphoinositide 3-kinase γ during T and B Lymphocyte Homing. *Immunity*, **21**, 429-441.

Okkenhaug, K., Bilancio, A., Farjot, G., Priddle, H., Sancho, S., Peskett, E., Pearce, W., Meek, S.E., Salpekar, A., Waterfield, M.D., Smith, A.J.H., and Vanhaesebroeck, B. (2002) Impaired B and T cell antigen receptor signalling in p110 δ PI 3-kinase mutant mice. *Science*, **297**, 1031-1034.

Otsu, M., Hiles, I., Gout, I., Fry, M.J., Ruiz-Larrea, F., Panayotou, G., Thompson, A., Dhand, R., Hsuan, J., Totty, N., Smith, A.D., Morgan, S.J., Courtneidge, S.A., Parker, P.J., and Waterfield, M.D. (1991) Characterization of two 85 kD proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60^{C-src} complexes and PI3-kinase. *Cell*, **65**, 91-104.

Overduin, M., Cheever, M.L., and Kutateladze, T.G. (2001) Signaling with Phosphoinositides: Better than Binary. *Molecular Interventions*, **1**, 150-159.

Pacold, M.E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C.T., Walker, E.H., Hawkins, P.T., Stephens, L., Eccleston, J.F., and Williams, R.L. (2000) Crystal Structure and Functional Analysis of Ras Binding to Its Effector Phosphoinositide 3-Kinase γ . *Cell*, **103**, 931-943.

Pakolitsa, C., de Pereda, J.M., Bagshaw, C.R., Critchley, D.R., and Liddington, R.C. (1999) Crystal structure of the Vinculin tail suggests a pathway for activation. *Cell*, **99**, 603-613.

Pap, E.H.W., Bastiaens, P.I.H., Borst, J.W., van den Berg, P.A.W., van Hoek, A., Snoek, G.T., Wirtz, K.W.A., and Visser, A.J.W.G. (1993) Quantitation of the Interaction of Protein Kinase C with Diacylglycerol and Phosphoinositides by Time-Resolved Detection of Resonance Energy Transfer. *Biochemistry*, **32**, 13310-13317.

Parker, M.G. (1993) Steroid and related receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **3**, 499-504.

Patrucco, E., Notte, A., Barberis, L., Selvetella, G., Maffei, A., Brancaccio, M., Marengo, S., Russo, G., Azzolino, O., Rybalkin, S.D., Silengo, L., Altruda, F., Wetzker, R., Wymann, M.P., Lembo, G., and Hirsch, E. (2004) PI3K γ modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and-independent effects. *Cell*, **118**, 375-387.

- Pawelczyk, T., and Matecki, A. (1999) Phospholipase C- δ 3 binds with high specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidic acid in bilayer membranes. *Eur. J. Biochem.*, **262**, 291-298.
- Pawson, T., and Nash, P. (2003) Assembly of Cell Regulatory Systems Through Protein Interaction Domains. *Science*, **300**, 445-452.
- Perisic, O., Fong, S., Lynch, D.E., Bycroft, M., and Williams, R.L. (1998) Crystal structure of a Calcium-Phospholipid Binding Domain from cytosolic Phospholipase A2. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1596-1604.
- Philip, F., Guo, Y., and Scarlata, S. (2002) Multiple roles of pleckstrin homology domains in phospholipase C β function. *FEBS Letters*, **531**, 28-32.
- Pierce, K.L., Premont, R.T., and Lefkowitz R.J. (2002) Seven-Transmembrane Receptors. *Nature*, **3**, 639-650.
- Pirola, L., Zvelebil, M.J., Bulgarelli-Leva, G., Van Obberghen, E., Waterfield, M.D., and Wymann, M.P. (2001) Activation loop sequences confer substrate specificity to phosphoinositide 3-kinase α (PI3K α). *J. Biol. Chem.*, **276**, 21544-21554.
- Prestwich, G.D. (2004) Visualizing signalling by phosphoinositide 3-kinase pathway lipids. *Biochemical Society Transactions*, **32**, 336-337.
- Proco, E., and McColl, S.R. (2005) Leukocytes on the move with phosphoinositide 3-kinase and its downstream effectors. *BioEssays*, **27**, 153-163.
- Puri, K.D., Doggett, T.A., Huang, C.-Y., Douangpanya, J., Hayflick, J.S., Turner, M., Penninger, J., and Diacovo, T.G. (2005) The role of endothelial PI3K γ activity in neutrophil trafficking. *Blood*, **106**, 150-157.
- Rameh, L.E., and Cantley, L.C. (1999) The Role of Phosphoinositide 3-kinase Lipid Products in Cell Function. *J. Biol. Chem.*, **274**, 8347-8350.
- Randazzo, P.A. (1997) Functional Interaction of ADP-ribosylation Factor 1 with Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *J. Biol. Chem.*, **272**, 7688-7692.
- Rebecchi, M., Peterson, A., and McLaughlin, S. (1992) Phosphoinositide-specific Phospholipase C- δ 1 binds with high affinity to Phospholipid-Vesicles containing Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *Biochemistry*, **31**, 12742-12747.
- Ridley, A.J. (2001) Rho proteins, PI 3-kinases, and monocyte/macrophage motility. *FEBS Letters*, **498**, 168-171.
- Rodriguez-Borlado, L., Barber, D.F., Hernandez, C., Rodriguez-Marcos, M.A., Sanchez, A., Hirsch, E., Wymann, M., Martinez, A.C., and Carrera, A.C. (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the CD4/CD8 T cell differentiation ratio. *J. Immunol.*, **170**, 4475-4482.
- Romoser, V., Ball, R., and Smrcka, A.V. (1996) Phospholipase C β 2 Association with Phospholipid interfaces assessed by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *J. Biol. Chem.*, **271**, 25071-25078.

- Rytömaa, M., and Kinnunen, K.J. (1994) Evidence for two distinct acidic Phospholipid-binding sites in Cytochrome c. *J. Biol. Chem.*, **269**, 1770-1774.
- Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Horie, Y., Bachmaier, K., Fata, J.E., Li, M., Suzuki, A., Bouchard, D., Ho, A., Redston, M., Gallinger, S., Khokha, R., Mak, T.W., Hawkins, P.T., Stephens, L., Scherer, S.W., Tsao, M., and Penninger J.M. (2000b) Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)K γ . *Nature*, **406**, 897-901.
- Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Jones, R.G., Oliveira-dos Santos, A.J., Stanford, W.L., Bolon, B., Wakeham, A., Itie, A., Bouchard, D., Kozieradzki, I., Joza, N., Mak, T.W., Ohashi, P.S., Suzuki, A., and Penninger, J.M. (2000a) Function of PI3K γ in Thymocyte Development, T Cell Activation, and Neutrophil Migration. *Science*, **287**, 1040-1046.
- Shimohama, S., Kamiya, S., Fujii, M., Ogawa, T., Kanamori, M., Kawamata, J., Imura, T., Taniguchi, T., and Yagisawa, H. (1998) Mutation in the Pleckstrin Homology Domain of the human Phospholipase C- δ 1 gene is associated with loss of function. *BBRC*, **245**, 722-728.
- Shioi, T., Kang, P.M., Douglas, P.S., Hampe, J., Yballe, C.M., Lawitts, J., Cantley, L.C., and Izumo, S. (2000) The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.*, **19**, 2537-2548.
- Shirai, R., Morita, K., Nishikawa, A., Nakatsu, N., Fukui, Y., Morisaki, N., and Hashimoto, Y. (1999) The structural Requirement of Phosphatidylinositols as Substrates of Phosphatidylinositol 3-kinase. *Tetrahedron Letters*, **40**, 1693-1696.
- Simoës, A.P., Camps, M., Schnabel, P., and Gierschik, P. (1995) Mutational analysis of a putative polyphosphoinositide binding site in phospholipase C- β 2. *FEBS Letters*, **365**, 155-158.
- Songyang, Z., and Cantley, L.C. (1995) Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 470-475.
- Stahelin, R.V., Burian, A., Bruzik, K., Murray, D., and Cho, W. (2003) Membrane Binding Mechanisms of the PX Domains of NADPH Oxidase p40^{phox} and p47^{phox}. *J. Biol. Chem.*, **278**, 14469-14479.
- Stahelin, R.V., Long, F., Peter, B.J., Murray, D., De Camilli, P., McMahon, H.T., and Cho, W. (2003) Contrasting membrane interaction mechanisms of AP180 N-terminal Homology (ANTH) and Epsin N-terminal Homology (ENTH) Domains. *J. Biol. Chem.*, **278**, 28993-28999.
- Stephens, L., Smrcka, A., Cooke, F.T., Jackson, T.R., Sternweis, P.C., and Hawkins, P.T. (1994) A novel Phosphoinositide 3 Kinase Activity in myeloid-derived cells is activated by G Protein $\beta\gamma$ subunits. *Cell*, **77**, 83-93.
- Stephens, L.R., Eguinoa, A., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Cooke, F., Coadwell, J., Smrcka, S., Thelen, M., Cadwallader, K., Tempst, P., and Hawkins, P.T. (1997) The G $\beta\gamma$ Sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell*, **89**, 105-114.
- Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nürnberg, B., Gierschik, P., Seedorf, K., Hsuan, J.J., Waterfield, M.D., Wetzker, R. (1995) Cloning and Characterization of a G Protein-Activated Human Phosphoinositide-3 Kinase. *Science*, **269**, 690-693.

- Stoyanova, S., Bulgarelli-Leva, G., Kirsch, C., Hanck, T., Klinger, R., Wetzker, R., and Wymann, M.P. (1997) Lipid kinase and protein kinase activities of G-protein-coupled phosphoinositide 3-kinase γ : structure-activity analysis and interactions with wortmannin. *Biochem. J.*, **324**, 489-495.
- Streuli, M. (1996) Protein tyrosine phosphatases in signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 182-188.
- Suire, S., Coadwell, J., Ferguson, G.J., Davidson, K., Hawkins, P., and Stephens, L. (2005) p84, a new G $\beta\gamma$ -activated regulatory subunit of the Type IB Phosphoinositide 3-Kinase p110 γ . *Current Biology*, **15**, 566-570.
- Suire, S., Hawkins, P., and Stephens, L. (2002) Activation of Phosphoinositide 3-Kinase γ by Ras. *Current Biology*, **12**, 1068-1075.
- ten Dijke, P., Miyazono, K., Heldin, C.-H. (1996) Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 139-145.
- Terauchi, Y., Tsuji, Y., Satoh, S., Minoury, H., Murakami, K., Okuno, A., Inukai, K., Asano, T., Kaburagi, Y., Ueki, K., Nakajima, H., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., Sekihara, H., Yin, Y., Barrett, J.C., Oda, H., Ishikawa, T., Akanuma, Y., Komuro, I., Suzuki, M., Yamamura, K., Kodama, T., Suzuki, H. and Kadowaki, T. (1999) Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 α subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat. Genet.*, **21**, 230-235.
- Toker, A. (2002) Phosphoinositides and signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 761-779.
- Tornay, S., Björklöf, K., Laffargue, M., Küenzi, P., Reuther, G.W., Hirsch, E., Finan, P., and Wymann, M.P. (2003) Novel G protein-independent activation of PI3K γ via Ca²⁺ and PKC regulates allergy. *Abstract P023 des Biochemical Society Focused Meeting "PI 3-Kinase un Signalling and Disease"*.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.
- Traynor-Kaplan, A.E., Harris, A., Thompson, B., Taylor, P., and Sklar, L.A. (1988) An inositol tetrakisphosphate-containing phospholipid in activated neutrophils. *Nature*, **334**, 353-356.
- Tsujita, K., Itoh, T., Ijuin, T., Yamamoto, A., Shisheva, A., Laporte, J., and Takenawa, T. (2004) Myotubularin Regulates the Function of the Late Endosome through the GRAM Domain-Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate Interaction. *J. Biol.Chem.*, **279**, 13817-13824.
- Ueki, K., Yballe, C.M., Brachmann, S.M., Vicent, D., Watt, J.M., Kahn, C.R., and Cantley, L.C. (2002) Increased insulin sensitivity in mice lacking p85 β subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 419-424.
- Van Paridon, P.A., de Kruijff, B., Ouwerkerk, R., and Wirtz, K.W.A. (1986) Polyphosphoinositides undergo charge neutralization in the physiological pH range: a ³¹P-NMR study. *BBA*, **877**, 216-219.
- Vanhaesebroeck, B., Higashi, K., Raven, C., Welham, M., Anderson, S., Brennan, P., Ward, S.G., and Waterfield, M.D. (1999) a) Autophosphorylation of p110 δ phosphoinositide 3-kinase: a new paradigm for regulation of lipid kinases in vitro and in vivo. *EMBO J.*, **18**, 292-1999.

- Vanhaesebroeck, B., Jones, G.E., Allen, W.E., Zicha, D., Hooshmand-Rad, R., Sawyer, C., Wells, C., Waterfield, M.D. and Ridley, A.J. (1999 b) Distinct PI(3)Ks mediate mitogenic signalling and cell migration in macrophages. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 69-71.
- Vanhaesebroeck, B., Rohn, J.L., and Waterfield, M. (2004) Gene Targeting: Attention to Detail. *Cell*, **3**, 274-276.
- Vanhaesebroeck, B., Welham, M.J., Kotani, K., Stein, R., Warne, P.H., Zvelebil, M.J., Higashi, K., Volinia, S., Downward, J., and Waterfield, M.D. (1997) p110 δ , a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4330-4335.
- Vecchione, C., Patrucco, E., Marino, G., Barberis, L., Poulet, R., Aretini, A., Maffei, A., Gentile, M.T., Storto, M., Azzolino, O., Brancaccio, M., Colussi, G.L., Bettarini, U., Altruda, F., Silengo, L., Tarone, G., Wymann, M.P., Hirsch, E., and Lembo, G. (2005) Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3K γ . *J.E.M.*, **201**, 1217-1228.
- Vetter, I.R., Arndt, A., Kutay, U., Görlich, D., and Wittinghofer, A. (1999) Structural view of the Ran-Importin β interaction at 2.3 Å Resolution. *Cell*, **97**, 635-646.
- Voigt, P., Brock, C., Nürnberg, B., and Schaefer, M. (2005) Assigning functional domains within the p101 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma. *J. Biol. Chem.*, **280**, 5121-5127.
- Walker, E.H., Pacold, M.E., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P.T., Wymann, M.P., and Williams, R.L. (2000) Structural Determinants of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition by Wortmannin, LY294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine. *Molecular Cell*, **6**, 909-919.
- Walker, E.H., Perisic, O., Ried, C., Stephens, L. and Williams, R.L. (1999) Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature*, **402**, 313-320.
- Wang, J., Gambhir, A., Hangyas-Mihalyne, G., Murray, D., Golebiewska, U., and McLaughlin, S. (2002) Lateral Sequestration of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate by the basic effector domain of Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate is due to non-specific electrostatic Interactions. *J. Biol. Chem.*, **277**, 34401-34412.
- Wang, Q., Bilan, P.J., Tsakiridis, T., Hinek, A., and Klip A. (1998) Actin filaments participate in the relocalization of phosphatidylinositol 3-kinase to glucose transporter-containing compartments and in the stimulation of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.*, **331**, 917-928.
- Wedegaertner, P.B. (1998) Lipid Modifications and Membrane Targeting of G α . *Biol. Signals Recept.*, **7**, 125-135.
- Wetzker, R. (2004) Irrungen und Perspektiven der Phosphoinositid 3-Kinase-Forschung. *Biospektrum*, **5**, 620-622.
- Wymann, M.P., and Pirola, L. (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *BBA*, **1436**, 127-150.
- Wymann, M.P., Zvelebil, M., and Laffargue, M. (2003) Phosphoinositide 3-kinase signalling- which way to target. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. **24**, 366-376.

- Xie, Z., Ho, W.T., and Exton, J.H. (1998) Association of N-and C-terminal domains of phospholipase D is required for catalytic activity. *J. Biol. Chem.*, **273**, 34679-34692.
- Yaffe, M.B. (2002) Phosphotyrosine-Binding Domains In Signal Transduction. *Nature*, **3**, 177-186.
- Yagisawa, H., Sakuma, K., Paterson, H.F., Cheung, R., Allen, V., Hirata, H., Watanabe, Y., Hirata, M., Williams, R.L., and Katan, M. (1998) Replacements of single basic amino acids in the Pleckstrin Homology Domain of Phospholipase C- δ 1 alter the Ligand Binding, Phospholipase Activity, and Interaction with the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.*, **273**, 417-424.
- Yamauchi, E., Titani, K., and Taniguchi, H. (1997) Specific Binding of acidic Phospholipids to Microtubule-associated Protein MAP1B regulates its Interaction with Tubulin. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22948-22953.

Publikationsverzeichnis

Publikationen

Stoyanova S, Bulgarelli-Leva G, **Kirsch C**, Hanck T, Klinger R, Wetzker R, Wymann MP.: Lipid kinase and protein kinase activities of G-protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma: structure-activity analysis and interactions with wortmannin. *Biochem J.* 1997 Jun 1;324 (Pt 2):489-495.

Bauer A, **Kirsch C**, Pissowotzki K, Klinger R, Wollina U.: Vergleichende Untersuchungen der phosphoinositidabhängig vermittelten Signaltransduktion in Epithelzellen unterschiedlicher Proliferationspotenz. *Zeitschrift für Hautkrankheiten* 1997;72:701.

Bauer A, **Kirsch C**, Wollina U, Klinger R.: Identification of 55 kDa phosphatidylinositol 4-kinase in HaCaT cells: comparison with the epithelial cell line A431. *Int J Mol Med.* 1998 Jul;2(1):91-94.

DeWolf C, Leporatti S, **Kirsch C**, Klinger R, Brezesinski G.: Phase separation in phosphatidylinositol/phosphatidylcholine mixed monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids* 1999;97:129-138.

Soom M, Schönherr R, Kubo Y, **Kirsch C**, Klinger R, Heinemann SH.: Multiple PIP2 binding sites in Kir2.1 inwardly rectifying potassium channels. *FEBS Lett.* 2001 Feb 9;490(1-2):49-53.

Kirsch C, Wetzker R, Klinger R.: Anionic phospholipids are involved in membrane targeting of PI 3-kinase gamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Apr 6;282(3):691-696.

Gedrange T, Lupp A, **Kirsch C**, Harze W, Klinger R.: Influence of the sagittal advancement of mandibulae on myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain content in the masticatory muscles of pigs. *Folia Histochem Cytobiol.* 2002;40(3):277-284.

Scholl S, **Kirsch C**, Böhmer FD, Klinger R.: Signal transduction of c-Kit receptor tyrosine kinase in CHRF myeloid leukemia cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004 Dec;130(12):711-718.

Rapedius M, Soom M, Shumilina E, Schulze D, Schönherr R, **Kirsch C**, Lang F, Tucker SJ, Baukrowitz T.: Long chain CoA esters as competitive antagonists of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate activation in Kir channels. J Biol Chem. 2005 Sep 2;280(35):30760-30767.

Knauth P, Schlüter T, Czubayko M, **Kirsch C**, Florian V, Schreckenberger S, Hahn H, Bohnensack R.: Functions of sorting nexin 17 domains and recognition motif for P-selectin trafficking. J Mol Biol. 2005 Apr 8;347(4):813-825.

Konferenzpräsentationen

Kirsch C, Siegmund J, Klinger R.: Interaction of the PI 3-kinase γ with liposomes and cellular membranes. 5th Joint Meeting Signal Transduction Society. Weimar 2001.

Schmidt C, **Kirsch C**, Schilli-Westermann M, Klinger R.: Investigations to structure-function relationships in phosphoinositide 3-kinase γ . 7th Joint Meeting Signal Transduction Society. Weimar 2003.

Wachowiak St, Schmidt C, Schilli-Westermann M, Klinger R, **Kirsch C**.: Three domains are involved in binding of phosphoinositide 3-kinase γ to plasma membrane. 8th Joint Meeting Signal Transduction Society. Weimar 2004.

Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Cornelia Kirsch geb. Roßbach, verw. Stobbe
Geburtsdatum:	25. April 1960
Geburtsort:	Jena
Staatsbürgerschaft:	deutsch
Familienstand:	verheiratet, ein Kind
Schulbildung:	1966-1976 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule, Abschluss: 10. Klasse (Prädikat „sehr gut“)
Berufsbildung und Studium:	1979-1982 Abendschule, Abschluss: Abitur (1,75)
	1976-1979 Medizinische Fachschule Jena, Abschluss: Medizinisch-technische Laborassistentin (MTA)
	1988-1993 Fernstudium an der Abteilung Ingenieurschule für Chemie der Staatlichen Technikerschule Berlin, Abschluss: Ingenieur für Laboratoriumstechnik der Chemie (Gesamtprädikat „gut“, Ingenieurarbeit: „Untersuchungen zur wachstumsfaktor- abhängigen Beeinflussung der Phosphatidylinositol-4-Kinase in A431-Zellen“, Bewertung „sehr gut“)
	1993-1994 Direktstudium (Aufbaustudium) an der Fachhochschule Merseburg, Abschluss: Diplomingenieur (FH) (Gesamtprädikat „gut“, Diplomarbeit: „Regulation der Phosphatidylinositol-4- Kinase-Aktivität durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse, Bewertung „sehr gut“)
Berufspraxis:	1979-1986 Friedrich-Schiller-Universität Jena, Abt. Gebietsblutspende, MTA
	1986-1993 Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät, MTA (seit 1992 leitende MTA)
	seit 1994 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie II des Klinikums der FSU Jena

Jena, den 7. 12. 2005

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 7. 12. 2005

.....
Cornelia Kirsch

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Promotionsarbeit mit freundlichem Rat, Diskussion und sonstiger Hilfe unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Klinger für die jahrelange fachliche und persönliche Unterstützung, die Möglichkeit zur freien Entfaltung und ganz besonders dafür, dass er mir jederzeit ein kompetenter Ansprechpartner war.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Wetzker gilt mein besonderer Dank für fachlichen Rat und Diskussion, sowie die großzügige Bereitstellung von Arbeitsmaterialien (Baculoviren und Antikörper).

Herrn Prof. Dr. Dr. Reinhard Neubert danke ich für seine Bereitschaft als Gutachter dieser Arbeit zu wirken.

Herrn Prof. Dr. Bernd Wiederanders gilt mein Dank für die Unterstützung meines Promotionsantrages beim Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie danke ich herzlich für die freundliche Zusammenarbeit, Karl-Heinz für sein jederzeit offenes Ohr, Margret und Carsten für die vielen schönen Stunden im Labor und Inge für ihre hervorragende Unterstützung bei den Laborarbeiten.